

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



* 5 3 0 9 6 0 7 3 2 7 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**DIFERENCIACION DE LAS CELULAS DE MÜLLER (GLIA) DE LA RETINA.
ESTUDIO EN EL EMBRION DE POLLO**

Trabajo realizado por Juan Ignacio Medina Crespo, en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Carmen Prada Elena

Fdo. Carmen Prada Elena
Profesora Titular de Biología
Facultad de Medicina

Fdo. Juan Ignacio Medina Crespo
Licenciado en Ciencias Biológicas



ARCHIVO

Madrid, Abril de 1996

AGRADECIMIENTOS

Han sido muchas las personas que, con aportaciones grandes o pequeñas, pero siempre importantes, han colaborado en la realización de esta Tesis Doctoral, a veces simplemente ofreciéndome su simpatía o comprensión.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Carmen Prada, quien me ofreció la oportunidad de formarme e investigar en su laboratorio en el campo de la Neurobiología. A ella debo mi interés en este campo y gran parte de mi formación. He de agradecerle también la dirección de esta Tesis Doctoral. Sin ésta dirección y su constante apoyo, esta Tesis jamás se hubiera realizado.

A la Dra. Asunción Colino y al Dr. James V. Halliwell, por sus enseñanzas sobre la electrofisiología del Sistema Nervioso.

Al Dr. Alfonso Fairén, por permitirme usar su microscopio y equipo informático, esencial en las mediciones de células adultas.

Al Dr. Enrique de la Rosa, por ofrecernos el monoclonal 3CB2.

Al Dr. Francisco A. Prada, por permitirme disponer de sus preparaciones y por sus comentarios sobre este trabajo.

Al Dr. Carlos Navarro, por su ayuda en la modelización de la célula de Müller y el desarrollo del método de cálculo de su superficie.

Al Dr. Galo Ramírez y a los miembros de su equipo, por la ayuda constante que nos han prestado en tantos aspectos.

A las doctoras Meritxell López Gallardo y Rosario López López, mis compañeras de laboratorio, y a Ana Isabel Henche, por su ayuda en el montaje final de esta Tesis. También por brindarme su amistad y por el agradable ambiente de trabajo que, gracias a ellas, disfrutamos en el laboratorio.

A los miembros del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, por su ayuda y apoyo.

A mi familia, en Madrid y en Toledo. Sin su apoyo y cariño, hubiera sido totalmente imposible la realización de esta Tesis.

A todos los amigos que me han apoyado y animado a seguir. Contar con buenos amigos es importante, sobre todo cuando apenas se les puede ver por la dedicación que exige la realización de una Tesis Doctoral.

**DEDICADO A MIS DOS FAMILIAS,
EN MADRID Y EN TOLEDO,
Y A ANA**

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. ESTRUCTURA DE LA RETINA	2
1.2. LA GLIA DE LA RETINA	5
1.3. LA CELULA DE MULLER ADULTA	8
1.3.1 Distribución	8
1.3.2 Morfología	8
1.3.3 Citología	15
1.3.3.1 La membrana plasmática	15
1.3.3.2 Los orgánulos intracelulares	16
1.3.3.3 El citoesqueleto	17
1.3.3.4 Marcadores de la célula de Müller	19
1.3.4 Función	20
1.3.4.1 Función de soporte y aislamiento.	20
1.3.4.2 Función nutritiva y metabólica	21
1.3.4.3 Mantenimiento de la homeostasia retinal	21
1.3.4.4 Papel en la migración celular	23
1.3.4.5 Mecanismos de comunicación con las neuronas	24
1.4 DIFERENCIACION DE LA CELULA DE MULLER	27
1.4.1 Proliferación: el neuroepitelio de la retina	27
1.4.2 Neurogénesis y gliogénesis en la retina	30
1.4.3 Morfogénesis de la célula de Müller	34
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIAL Y METODOS	45
3.1 MATERIAL	46
3.1.1 Instrumentos	46
3.1.2 Material biológico	46
3.1.3 Productos químicos	46
3.2 METODOS	48
3.2.1 Método de disociación celular de retina de pollo	48
3.2.2 Inmunocitoquímica	49
3.2.3 Documentación de los resultados	50
4. RESULTADOS	52
4.1 DISGREGACION DE LA CELULA DE MÜLLER CONSERVANDO SU INTEGRIDAD ESTRUCTURAL	53
4.1.1 Resumen	57
4.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FORMAS CELULARES OBSERVADAS EN LOS DISGREGADOS Y EN PREPARACIONES DE GOLGI	58
4.2.1 Morfogénesis	58
4.2.2 Formas adultas	62
4.2.3 Resumen	65

4.3 CUANTIFICACION DEL INCREMENTO DE LA SUPERFICIE DE MEMBRANA DE LA CELULA DE MULLER A LO LARGO DEL DESARROLLO	67
4.3.1 Desarrollo del método de cálculo de la superficie celular	67
4.3.1.1 Método para la estimación de la superficie de la célula adulta	71
4.3.1.2 Método para la estimación de la superficie de las células embrionarias	74
4.3.2 Valores de la superficie de la célula entre E13 y el adulto	75
4.3.3 Resumen	78
4.4 EXPRESION DE MOLECULAS DEL CITOESQUELETO DE LAS CELULAS DE MULLER	79
4.4.1 Desarrollo de un método de inmunocitoquímica para el estudio del citoesqueleto de las células disgregadas	79
4.4.2 Expresión de 3CB2	81
4.4.3 Expresión de α -tubulina y β -actina	89
4.4.4 Resumen	92
5. DISCUSION	93
5.1 METODO DE DISOCIACION CELULAR	94
5.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FORMAS CELULARES OBSERVADAS EN LOS DISGREGADOS Y EN PREPARACIONES DE GOLGI: MORFOGENESIS Y ESTRUCTURA ADULTA	100
5.3 ESTUDIO DE LA SUPERFICIE DE MEMBRANA DE LAS CELULAS DE MULLER	109
5.4 EXPRESION DE MOLECULAS DE CITOESQUELETO	115
6. CONCLUSIONES	122
7. BIBLIOGRAFIA	125

ABREVIATURAS

BSA:	Albúmina bovina.
CCB:	Capa de conos y bastones.
CCG:	Capa de células ganglionares.
CFNO:	Capa de fibras del nervio óptico.
CNE:	Capa nuclear externa.
CNI:	Capa nuclear interna.
CPE:	Capa plexiforme externa.
CPI:	Capa plexiforme interna.
EA:	Etanol-ácido acético (3:1).
EDTA:	Acido etilendiamino tetraacético.
EFA:	Etanol-formol-ácido acético (18:1:1).
EGTA:	Acido etilenglicol bis(β -aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético.
EP:	Epitelio pigmentario.
ES:	Espacio subretinal.
G ₁ :	Primera parte de la interfase, desde el final de la mitosis hasta el inicio de la fase de síntesis de ADN.
G ₂ :	Tercera parte de la interfase, desde el final de la fase de síntesis de ADN hasta el inicio de la mitosis.
GABA:	Acido gamma-aminobutírico.
GFAP:	Proteína fibrilar ácida glial.
HEPES:	Acido N-(2-hidroxietil) piperacín-2-etilsulfónico.
IFAP:	Proteína asociada a filamentos intermedios.
M:	Fase de mitosis.
MLE:	Membrana limitante externa.
MLI:	Membrana limitante interna.
PFA:	Paraformaldehído.
S:	Fase de síntesis de ADN.
SF:	Proteasa empleada en este trabajo, extraída de <i>Streptomyces fradiae</i> .
SNC:	Sistema nervioso central.

1. INTRODUCCION

1.1. ESTRUCTURA DE LA RETINA

La retina de los vertebrados es una fina lámina de tejido nervioso situada en el fondo del ojo. Su función consiste en recibir las señales luminosas y transformarlas en una serie de impulsos nerviosos que son enviados al cerebro a través del nervio óptico. Gran parte del conocimiento que hoy tenemos sobre la estructura de la retina lo debemos a los trabajos de Ramón y Cajal (1892), realizados en buen número de especies de vertebrados. Ramón y Cajal describió y estudió todas las clases de neuronas de la retina, menos las células interplexiformes, y también dos tipos de células de glía, los astrocitos y las células de Müller (figura 1.1). En la retina de algunas especies, como el pollo, el único tipo de célula de glía descrito es la célula de Müller, objeto de este trabajo de tesis.

La retina es parte del SNC, puesto que se desarrolla a partir de una porción del prosencéfalo, que posteriormente se diferencia en el diencéfalo embrionario. En la parte anterior ventral de esta porción del SNC y a cada lado de la línea media, se produce una evaginación que da origen a la vesícula óptica. A su vez, el neuroepitelio de la vesícula óptica sufre una invaginación secundaria, con lo que la vesícula óptica se transforma en la copa óptica, que queda unida al resto del cerebro por el tallo óptico y, posteriormente, por el nervio óptico (Rodiek, 1973). Entre las dos paredes de la copa óptica queda el ventrículo, que es un espacio continuo con los ventrículos del cerebro. Posteriormente, este espacio se colapsa y se convierte en un espacio virtual (ver figura 1.2).

El epitelio interno de la copa óptica constituye el neuroepitelio de la retina, del que se formará la retina neural adulta, auténtico tejido nervioso formado por seis clases de neuronas y por células de glía. El epitelio externo permanece con una sola capa de células,

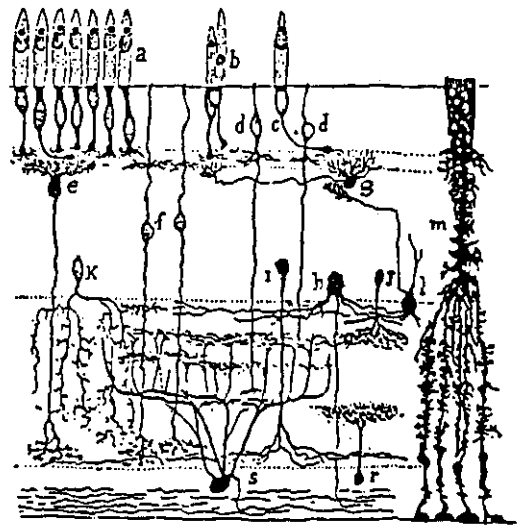


Figura 1.1 (Ramón y Cajal, 1909-1911, modificado).

Dibujo semiesquemático de la retina de lagarto (*Lacerta viridis*) teñida con el método de Golgi. Sobre el original de Cajal hemos introducido una célula de Müller (m) y una posible interplexiforme (l), esta última dibujada por él en una retina de perro. a, b y c: conos, d: bipolar desplazada, e y f: bipolares, g: horizontal, h: ganglionar desplazada, i, j, k: amacrinas, r: amacrina desplazada, s: ganglionar.

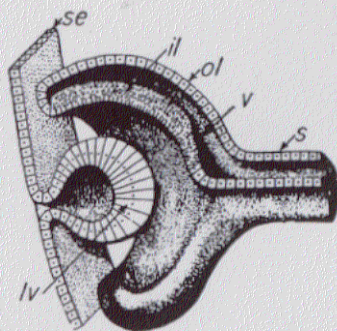


Figura 1.2 (Adaptado por Rodieck, 1973, de Walls, 1942, y modificado)

Sección transversal de una reconstrucción tridimensional de la copa óptica, mostrando la capa interna (il), que formará la retina neural, y la externa (ol), que formará la retina pigmentaria. El espacio ventricular (v), situado entre ambas capas, se convertirá en un espacio virtual, el espacio subretinal; lv: vesícula del cristalino; s: tallo óptico; se: superficie del ectodermo.

y va a constituir el epitelio pigmentario de la retina, el cual no se diferencia como tejido nervioso, sino que queda como un epitelio de células de forma poligonal con abundantes invaginaciones en su cara externa y numerosas y largas prolongaciones en su cara interna, la cual contacta con la retina neural.

Dentro de la retina neural se distinguen seis capas al microscopio óptico, formadas por los somas de las células y sus prolongaciones (figura 1.3). Los somas celulares están dispuestos en tres capas nucleares, mientras que las prolongaciones forman las dos capas plexiformes y la capa de fibras del nervio óptico. Por su estructura en capas, relativamente sencilla comparada con otras partes del cerebro, ofrece ventajas como modelo experimental en Neurobiología. Las seis capas clásicamente descritas son:

1-Capa nuclear externa (CNE). En esta capa se sitúan, en varios niveles, los somas de los fotorreceptores (véase la figura 1.1).

2-Capa plexiforme externa (CPE). Es una capa de contactos sinápticos entre las prolongaciones internas de los fotorreceptores y las prolongaciones de las células horizontales, bipolares e interplexiformes (figura 1.1).

3-Capa nuclear interna (CNI). En ella se encuentran los somas de las células horizontales,

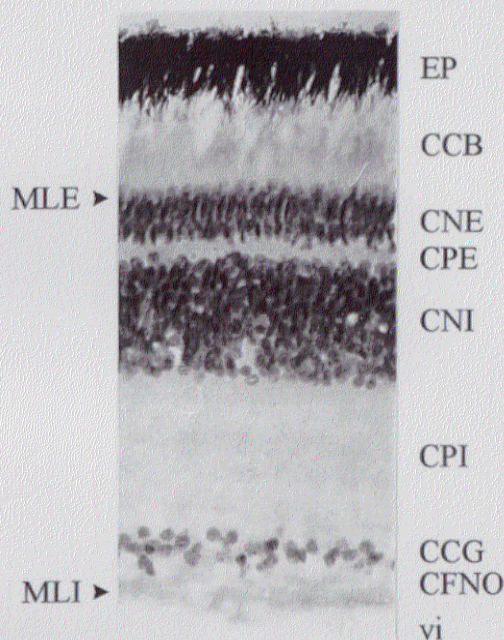


Figura 1.3

Sección de retina de pollo en E14 teñida por el método de Feulgen (preparación cedida por la Dra. Rosario López-López). En este estadio la estructura en capas de la retina es muy similar a la que hay en retina adulta. La tinción de Feulgen es específica de ADN, por lo que las capas nucleares se tiñen, mientras las capas de fibras son transparentes. La sección se orienta tal como se orientarán todas las figuras en este trabajo, con la parte ventricular o externa hacia arriba y la parte vítrea o interna hacia abajo. Las capas de la retina se abrevian como en el texto. vi: humor vítreo.

bipolares, amacrinas, interplexiformes y ganglionares desplazadas, así como los de las células de Müller (glia). Las células horizontales se sitúan formando la fila más externa de somas. Los somas de las células bipolares y de Müller están ocupando aproximadamente los dos tercios más externos de esta capa, mientras que las células amacrinas, las interplexiformes y las ganglionares desplazadas se sitúan en el tercio más interno (figura 1.1).

4-Capa plexiforme interna (CPI). En ella sinaptan las células bipolares, amacrinas, ganglionares desplazadas e interplexiformes por un lado, y las células ganglionares y amacrinas invertidas por otro (figura 1.1). En esta capa se distinguen aún hasta 7 estratos o subcapas, según la especie y la zona de la retina.

5-Capa de las células ganglionares (CCG). Está formada por los somas de las células ganglionares y los de las células amacrinas invertidas (figura 1.1).

6-Capa de fibras del nervio óptico (CFNO). Está formada por los axones de todas las células ganglionares, las normalmente situadas y las desplazadas, los cuales están orientados hacia la salida del nervio óptico (figura 1.1). Su grosor aumenta desde la retina periférica hasta la zona de donde sale el nervio óptico (cabeza del nervio óptico).

En la retina neural se distinguen dos membranas limitantes, la interna y la externa. La **membrana limitante interna (MLI)** está formada por la yuxtaposición, sin uniones de tipo especializado, de los pies de conexión vítreos de las células de Müller. Se halla separada del humor vítreo por una lámina basal. La llamada **membrana limitante externa (MLE)** está formada por uniones especializadas (uniones adherentes) entre los segmentos internos de los fotorreceptores, las mazas de Landolt (prolongaciones de algunas células bipolares) y las prolongaciones externas de las células de Müller. Al observar esta zona al microscopio óptico, daba la imagen de una membrana, por lo que se la denominó así. Entre la MLE y el epitelio pigmentario se observa una capa clara al microscopio óptico, la **capa de conos y bastones (CCB)**, también llamada espacio subretinal (**ES**), formada por los segmentos internos y externos de los fotorreceptores, el *microvilli* de las células de Müller y las prolongaciones internas de las células pigmentarias, cuyos somas forman el **epitelio pigmentario (EP)**. La célula de Müller es la única célula de la retina que ocupa todas las capas de la retina, desde la MLE hasta la MLI.

1.2. LA GLIA DE LA RETINA

Clásicamente, la glía del SNC se ha clasificado en dos grupos, la microglía y la macroglía. La microglía, descrita por vez primera por Río-Hortega (1919), está formada por varias poblaciones celulares con diferentes morfologías que tienen función fagocítica, por lo que se las considera parte del sistema retículo endotelial. Aunque su origen ha sido muy discutido (Theele y Streit, 1993), Río-Hortega ya apuntó que estas células podrían originarse de monocitos sanguíneos, y en la actualidad hay fuertes evidencias de que las células microgliales derivan de precursores de la médula ósea que migran al SNC durante el desarrollo y en respuesta a lesiones (Boya y col., 1986, 1987, 1991; Hickey y Kimura, 1988; Jordan y Thomas, 1988; Leong y Ling, 1992; Ling y Wong, 1993; Sievers y col., 1994). La macroglía incluye a los astrocitos y a los oligodendrocitos, ambos de origen ectodérmico, como el resto de células del SNC. Los astrocitos son células de aspecto estrellado con somas pequeños e irregulares y numerosas prolongaciones. En base a su morfología se dividen en fibrosos, que se sitúan principalmente en la sustancia blanca, y protoplásmicos, que se encuentran en la sustancia gris. Los oligodendrocitos son células pequeñas, con menos prolongaciones que los astrocitos. Se encuentran en el SNC mielinizando los axones de las neuronas. Río-Hortega (1919) también incluye dentro de los oligodendrocitos a las células satélite, que rodean los somas de algunas neuronas.

En el SNC existen además varias poblaciones de células de glía, entre ellas las células de Müller, orientadas radialmente y que comparten la característica de que una de sus prolongaciones o el soma están en contacto con el espacio ventricular del SNC (la célula de Müller contacta con el espacio subretinal, que en el embrión es continuo con la cavidad ventricular del diencefalo). Estas poblaciones, según Reichenbach y Robinson (1995), incluyen a los endotelios y células relacionadas y a la glía radial adulta clásicamente descrita (tanicitos y células de Müller). Algunas de estas células ocupan todo el grosor de la pared del SNC (tanicitos y células de Müller), mientras que otras sólo ocupan una parte (endotelios). La clasificación de las células de Müller como macroglía siempre ha sido motivo de controversia. Ya Ramón y Cajal (1892) hizo una distinción clara entre astrocitos y células de Müller, considerándolas diferentes tipos de glía. Numerosos autores, sin embargo, han considerado a las células de Müller como astrocitos modificados (Polyak, 1941; Magalhães y Coimbra, 1973 y muchos otros) o "variantes regionales del mismo tipo de

macroglía", como afirman recientemente Holländer y col. (1991). Otros autores, sin embargo, han señalado que ésto podría ser una simplificación, pues presentan también características ultraestructurales de oligodendrocitos (Rhodes, 1984; Stefansson y col., 1984; Prada, F. y col., 1989a) y ependimocitos (Prada, F. y col., 1989a).

Como en el resto del SNC, en la retina hay abundancia de células de glía. En las retinas avasculares de algunas especies de vertebrados, como es el caso del pollo, hay un solo tipo de glía, la célula de Müller o glía radial de la retina. Estas células fueron descubiertas en 1851 por Müller. Se extienden radialmente entre las dos limitantes de la retina. Su soma se encuentra en la CNI y las prolongaciones que parten desde sus dos polos, ventricular y vítreo, recubren buena parte de la superficie de las neuronas de la retina. En las retinas vasculares de otras especies, principalmente de mamíferos, se encuentran todos los otros tipos de células gliales: microglía, astrogía y oligodendroglía.

La microglía de la retina es similar a la del resto del SNC. Estas células proliferan cuando hay destrucción del tejido retinal (Wolter, 1957). Se establecen en la retina durante el desarrollo (Hume y col., 1983; Ashwell, 1989) y son capaces de migrar, al menos radialmente, hacia zonas lesionadas en las que hay detritus tisular (Thanos, 1992).

La astrogía de la retina fue descrita por Ramón y Cajal (1892). En las retinas sólo parcialmente vascularizadas los astrocitos se encuentran en las zonas donde hay vasos sanguíneos y no en las zonas avasculares (Stone y Dreher, 1987). Se sitúan entre las prolongaciones de las neuronas, principalmente en la CFNO, y adoptan distintas morfologías según su localización (Stone y Dreher, 1987; Distler y col., 1993; Ramírez y col., 1994). Su morfología y distribución pueden variar en respuesta a lesiones de la CFNO (Karschin y col., 1986). En algunas retinas, la misma población de astrocitos están asociados a los axones y a los vasos sanguíneos (Stone y Dreher, 1987; Distler y col., 1993; Karschin, 1986; Rungger-Brändle y col., 1993; Ramírez y col., 1994). En la retina del conejo, sin embargo, hay dos poblaciones separadas, una que se asocia con los axones, y otra que se asocia con los vasos sanguíneos (Schnitzer y Karschin, 1986). Estos astrocitos, que forman la glía perivascular, a su vez presentan varios tipos en base a su morfología (Triviño y col., 1992). Hay evidencias de que los astrocitos pueden ser de origen extrarretinal, y que penetran en la retina desde el nervio óptico (Watanabe y Raff, 1988). La entrada ocurre antes del establecimiento de la vasculatura, cuya formación parecen inducir (Jiang y col., 1995), pues promueven la diferenciación de precursores endoteliales preexistentes.

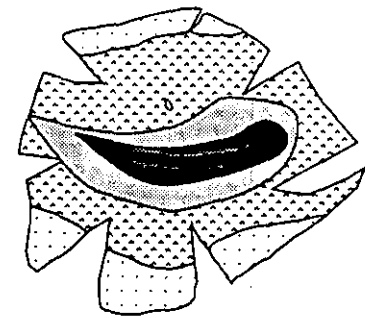
En la parte mielinizada de la retina del conejo se ha descrito además la existencia de oligodendroglía (Berliner, 1931; Schnitzer, 1988; Robinson y col., 1993; Ehinger y col., 1994), hecho que no ha sido señalado en la retina de otras especies. En retina de pollo hay trabajos que señalan la existencia de un pequeño número de células gliales cuyos somas se sitúan en la CCG (Ehrlich, 1981) y que son aproximadamente el 5% del total de células en esa capa (incluye las células ganglionares y las amacrinas desplazadas). Esta población, según Nakazawa y col. (1993), estaría formada mayoritariamente por oligodendrocitos que se forman tras la salida del ciclo de todas las neuronas y de las células de Müller, y cuyos precursores proliferan extraventricularmente.

1.3. LA CELULA DE MULLER ADULTA

Ramón y Cajal (1892) describió las células de Müller en todas las clases de vertebrados. Posteriormente, hasta la década de los sesenta, no fueron objeto de gran atención, pues se entendía que su papel era meramente estructural. Sin embargo, en los últimos 20 años han aparecido numerosos trabajos que tratan de su distribución, morfología, citología, fisiología y desarrollo.

1.3.1 Distribución

Las células de Müller se distribuyen por toda la retina, aunque su densidad no es la misma en toda ella. Así, la retina del conejo muestra un máximo en la región vascularizada de 14250-16650 células/mm² y un mínimo en la zona periférica de 5600-6500 células/mm² (Reichenbach y Wohlrab, 1983, 1986; Reichenbach, 1987; Robinson y Dreher, 1990), estimándose el número total de células de Müller por retina en 3.85-4.3 millones. En la figura 1.4 mostramos, a modo de ejemplo, un mapa con las áreas de isodensidad de células de Müller en retina de conejo elaborado por Robinson y Dreher (1990). En retinas de otras especies se han obtenidos resultados parecidos en cuanto al patrón de distribución, aunque los valores absolutos varían (Dräger y col., 1984; Newman y col., 1984; Gaur y col., 1988). No hemos encontrado datos referentes a la distribución en retina de pollo.



Células de Müller / mm²

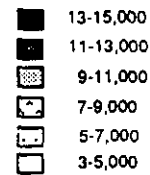


Figura 1.4 (Robinson y Dreher, 1990)

Ejemplo de mapa de isodensidad de células de Müller en retinas de conejos montadas en plano y marcadas con el monoclonal 4D6.

1.3.2 Morfología

Ramón y Cajal estudió la forma de las células de Müller en la retina de diversas especies de todas las clases de vertebrados mediante el uso de la técnica de Golgi. En la figura 1.5 puede observarse cómo, por una parte, su estructura básica es similar en todas las clases, aunque en cada una poseen características propias y, por otra parte, que la morfología de la célula varía en cada capa de la retina. Dentro de la complejidad que presentan estas

células se aprecia que en peces, anfibios y mamíferos, las células son relativamente simples, mientras que en reptiles, y sobre todo en aves, son más complejas. Existe un caso particular, el de la célula de Müller de la retina del camaleón, la cual es extraordinariamente compleja (véanse las figuras 1.6 y 1.7).

Según las descripciones y dibujos de Ramón y Cajal, la célula ocupa todo el grosor de la retina y su soma se sitúa en la CNI. La porción de célula que se extiende entre el soma y la MLE es la prolongación ventricular o externa y la que discurre entre el soma y la MLI es la prolongación vítrea o interna.

La prolongación ventricular tiene unas características similares en todas las especies. A nivel de la MLE muestra una placa de la que salen *microvilli* hacia el exterior, lo cual es común a todas las células que Reichenbach y Robinson (1995) incluyen dentro del grupo de la ependimoglia. En la CNE la prolongación es ancha y forma una especie de red de expansiones laminares que parecen recubrir completamente los somas de los fotorreceptores, aunque en la lagartija y el pollo no aparece tan claro. A nivel de la CPE la prolongación se estrecha. En esta capa confluyen, en algunas de las especies, pequeñas prolongaciones que parten de la célula a nivel del borde interno de la CNE y del borde externo de la CNI. En la CNI encontramos de nuevo expansiones que recubren los somas de las neuronas, aunque sólo ocupan toda la CNI en la rana, ya que en el resto de las especies dibujadas por Ramón y Cajal quedan restringidas a la parte comprendida entre el borde externo de la CNI y el núcleo, mientras que en el buey están apenas desarrolladas.

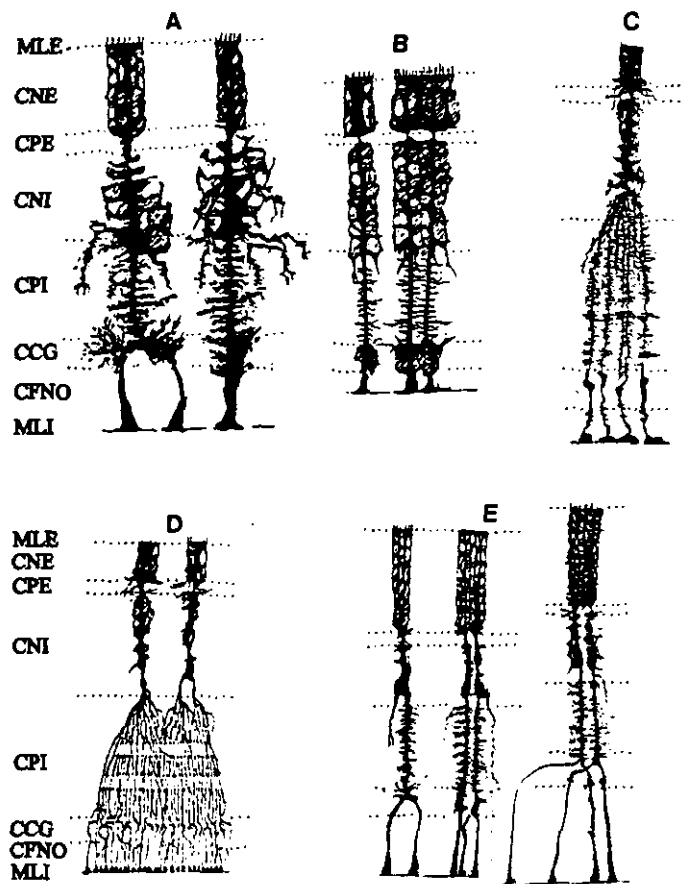


Figura 1.5 (Cajal, 1892)

Dibujos de células de Müller en una especie de cada clase de vertebrados. A: Pez teleosteo (*Cyprinus carpio*); B: anfibio (*Rana esculenta*); C: reptil (*Lacerta viridis*); D: ave (*Gallus domesticus*) E: mamífero (*Bos taurus*).

La prolongación vítrea puede ser simple, como en los casos de la carpa, rana y buey. En este caso emite tangencialmente numerosas prolongaciones pequeñas e irregulares, principalmente a nivel de la CPI. La prolongación se puede bifurcar a nivel de la CCG. En reptiles y aves es más compleja, pues se descompone en varias prolongaciones desde el soma o cerca de él. En éstas también se observan las prolongaciones tangenciales en la CPI. Tanto en las prolongaciones simples como en las complejas, es frecuente encontrar engrosamientos a nivel de la CCG, además de las bifurcaciones señaladas anteriormente. A nivel de la MLI, forman unos engrosamientos cónicos característicos, los llamados pies terminales.

Los estudios de Ramón y Cajal han sido complementados por otros más recientes realizados en especies de varias clases de vertebrados, en los que se han utilizado otras técnicas además del método de Golgi.

La célula de Müller del **camaleón** fue descrita por Ramón y Cajal (1892, figura 1.6), quien apuntó la existencia de una prolongación accesoria. Posteriormente, ha sido estudiada, también mediante el método de Golgi, por Prada, F. y col. (1979), quienes han encontrado un gran nivel de complejidad estructural (ver figura 1.7). La célula tiene prolongaciones gruesas que salen de la prolongación ventricular a nivel de la CNE (también llamada en el camaleón capa de Henle) y que siguen una trayectoria más o menos horizontal en la retina. A estas prolongaciones se les llama

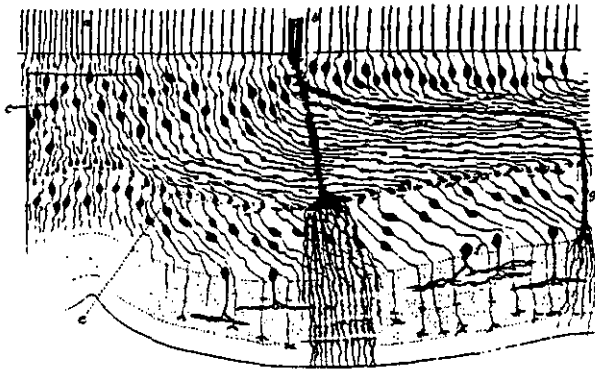


Figura 1.6 (Cajal, 1892)
Célula de Müller de la fovea central de la retina adulta del camaleón (*Chamaleo vulgaris*).

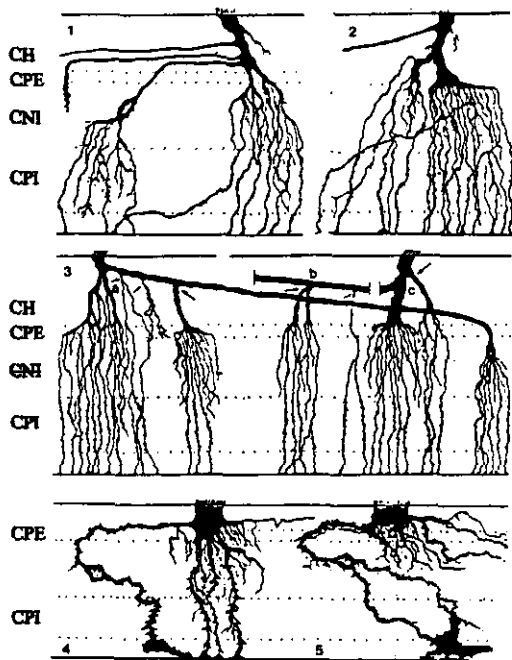


Figura 1.7 (Prada y col., 1979)
Dibujos de células de Müller en distintas regiones de la retina adulta del camaleón; 1: fovea; 2 y 3: retina central; 4 y 5: retina periférica; CH: capa de Henle; flecha en a y b: ramificación en prolongación accesoria; flecha en c: ramificación en prolongación no accesoria.

accesorias. En la zona central de la retina las células poseen normalmente una sola prolongación accesoria que termina en la CNI en un engrosamiento donde se sitúa el núcleo de la célula. En la zona foveal y en la parafoveal las células suelen presentar varias prolongaciones accesorias. Una de ellas, normalmente la de menor recorrido por la capa de Henle, es la que lleva el núcleo celular. En las zonas más periféricas de la retina la célula de Müller es simplemente un cuerpo grueso situado a nivel de la CNE del que salen numerosas prolongaciones, algunas de las cuáles llegan a la MLI. A medida que la zona va siendo menos periférica, la célula va presentando un mayor parecido con las de la retina central.

La célula de Müller del conejo ha sido, probablemente, la más estudiada entre la de los mamíferos. Reichenbach (1987) y Reichenbach y col. (1989) estudiaron la morfología de estas células mediante el método de Golgi y disgregación celular. En la figura 1.8 puede verse cómo en la parte central de la retina las células son largas y estrechas y tienen pies de anclaje vítreos también estrechos. Son muy patentes las expansiones laminares que emite la célula en la CNE, y que forman una estructura como en panal de abejas que engloba los somas de todos los



Figura 1.8 (Reichenbach y col., 1989)

Células teñidas con el método de Golgi en varias regiones de la retina del conejo, desde la zona más periférica (derecha) hasta la parte mielinizada (izquierda).

fotorreceptores. En la CNI no se observan laminaciones, sino pequeñas prolongaciones de aspecto irregular. También se observan pequeñas prolongaciones en la CPI. A nivel de la CCG y la CFNO se hace delgada y tiene un perfil liso. A veces se ramifica a nivel de la CFNO y forma 2 ó más pies vítreos. En la periferia de la retina la célula es mucho más corta y gruesa y los pies de anclaje vítreos son también mucho más gruesos. En las células disgregadas, la zona de la prolongación ventricular similar a un panal de abejas aparece formada por varias prolongaciones, no observándose las expansiones laminares. Según Reichenbach y Wohlrab (1986), los cambios de morfología de la célula están relacionados con

el distinto grosor de la zona de la retina en la que se halla. Robinson y Dreher (1990), mediante marcaje con peroxidasa y con anticuerpos monoclonales, obtuvieron unos resultados similares, aunque encontraron unas finas prolongaciones que parten cerca del soma y se ramifican a nivel de la CPI (figura 1.9). A partir de la CPE la prolongación ventricular se divide en ramificaciones que siguen un trayecto sinuoso hacia la MLE. Estas prolongaciones se hallan comunicadas por finas láminas que forman las expansiones esféricas observadas en tinciones de Golgi por Reichenbach y col. (1989).

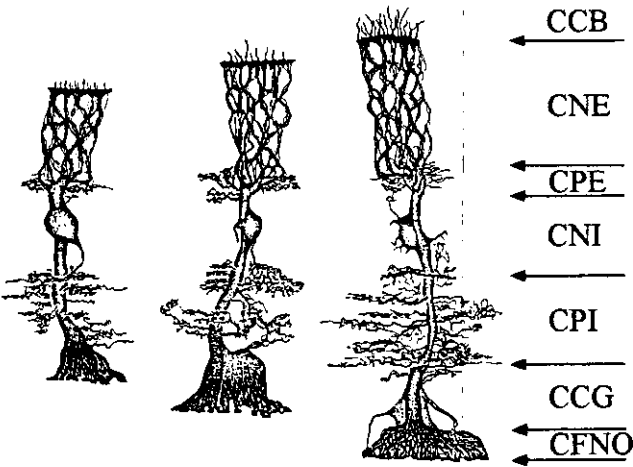


Figura 1.9 (Robinson y Dreher, 1990)

Dibujos a cámara clara de células de Müller de conejo teñidas con peroxidasa, mostrando su relación con las capas de la retina.

La célula de Müller del gato, a nivel de la CPI exhibe una especialización que no ha sido descrita en otras especies. Consiste en la emisión de numerosas prolongaciones radiales y largas, de modo que dan a la célula un aspecto estrellado a este nivel (Stone y col., 1991).

Otra de los mamíferos estudiados es el tupaya (Reichenbach y col., 1995), que tiene una retina cono-dominante. La célula de Müller es corriente que tenga 2 ó más prolongaciones vítreas en esta especie. Los autores sugieren que las retinas cono-dominantes podrían inducir la producción de varias prolongaciones vítreas, y las bastón dominantes, la producción de una sola prolongación.

Dreher y col. (1992) estudiaron la morfología de las células de Müller en varias especies de mamíferos con retinas vascularizadas y no vascularizadas. Para comprobar la hipótesis de que estas células participan en la distribución de nutrientes en la retina, estudiaron la posible relación entre la forma de las células y la vascularización de la retina. Encontraron 4 diferencias entre retinas vasculares y avasculares (figura 1.10). Las dos más interesantes son el menor grosor de las prolongaciones vítreas en las retinas avasculares y que las prolongaciones de la célula que rodean los somas de los fotorreceptores siguen recorridos más rectos y definidos en las retinas vasculares.

En la retina del **pollo**, Prada, F. y col. (1989b) describieron dos tipos de células de

Müller (figura 1.11). La prolongación ventricular de ambas células es idéntica y responde a la descripción hecha por Ramón y Cajal (1892). La porción de célula que atraviesa la CNE tiene un gran grosor y presenta pequeñas expansiones laminares. En la CPE la célula se estrecha y emite pequeñas prolongaciones radiales que quedan dentro de esta capa. A veces estas ramificaciones parten de la CNE y alcanzan la CPE. La célula vuelve a ensancharse a nivel de la CNI y su trayecto se hace sinuoso, pareciendo adaptarse a los somas de las neuronas adyacentes. De estas inflexiones salen cortas expansiones con una distribución radial. El soma se halla en el tercio medio de la CNI y es algo más ancho que el resto de la célula. De su polo vítreo parten prolongaciones que alcanzan la MLI siguiendo dos patrones diferentes que permiten distinguir dos tipos de células. El primero de estos tipos (células tipo I) es el ya descrito por Ramón y Cajal. Corresponde a células con abundantes prolongaciones que surgen del soma o de prolongaciones cortas que parten de él. El otro tipo (células tipo II) son células con sólo dos o tres prolongaciones que parten del soma y se ramifican a nivel de la CCG para dar varias prolongaciones que alcanzan la MLI. Aunque ambas células se encuentran distribuidas en toda la retina, las células tipo I son más abundantes en la retina central y las tipo II en la periférica. Ambos tipos de células pueden presentar prolongaciones accesorias que parten de distintos

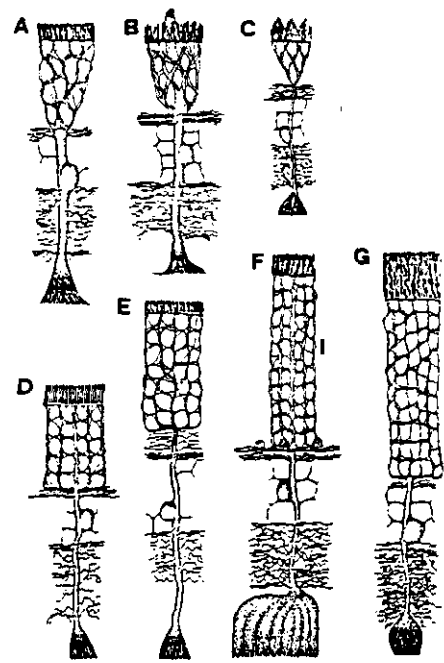


Figura 1.10 (Dreher y col., 1992)

Dibujo de células de Müller idealizadas de retinas de conejo en la zona no vascularizada (A), cobaya (B), equidna (C), rata (D), humano (E), perro (F) y gato (G). Las células en la parte superior pertenecen a retinas vascularizadas, y en la inferior a retinas avasculares.

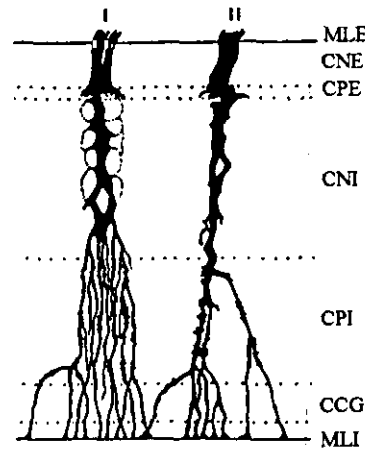


Figura 1.11 (Prada, F. y col., 1989b)

Células de Müller de retina de pollo en E17-18, estadios en los que su morfología es similar a la que presentan en estado adulto. I: célula tipo I; II: célula tipo II.

niveles de la prolongación ventricular, aunque son más abundantes en las células tipo II. En un trabajo posterior Prada, F. y col. (1989a) profundizan en el estudio de la variabilidad morfológica de estas células. Según la localización de las células dentro de la retina, la morfología de la célula va cambiando, como ocurre en el conejo (Reichenbach y Wohlrab, 1986). Así, cuanto más periférica es la célula, más corta y gruesa es, y menor es el número de prolongaciones que emite, también más cortas y gruesas. En la retina periférica se observa a menudo que las prolongaciones siguen un rumbo tangencial u oblicuo a través de la CPI antes de alcanzar la MLI. En la región del disco óptico la morfología se encuentra muy alterada. La mayor parte de los somas celulares están en la mitad externa de la retina. El polo externo del soma se continúa por medio de una banda de apariencia filamentosa de la que parten prolongaciones que viajan en dirección oblicua dentro de la zona del disco óptico. La parte interna de la célula se ramifica dando de cinco a ocho prolongaciones gruesas y arqueadas, que se distribuyen al azar dentro del disco óptico, el margen del disco óptico y la CPI de la retina, sin alcanzar la MLI. De este modo forman una densa red de prolongaciones, la cual se supone que podría actuar como una barrera para aislar la retina de los capilares sanguíneos.

En nuestra tesina de licenciatura hicimos un estudio sobre la morfología de las células de Müller adultas usando un método de disgregación celular puesto a punto en nuestro laboratorio, que extrae las células del Sistema Nervioso con un alto grado de preservación morfológica (Prada, C. y col., 1991; Prada, F. y col., 1995). En nuestras disociaciones no hemos podido identificar las células de tipo II descritas por Prada, F. y col. (1989b). observamos que la prolongación vítrea de todas las células se divide y forma uno o varios haces de numerosas prolongaciones que se dirigen hacia la MLI, formando lo que hemos denominado, por su apariencia en las disgregaciones, la "cabellera" vítrea. Por lo demás, nuestros resultados corroboran los de estos autores, y además nuestro método de disgregación nos ha permitido observar que la porción de la célula que atraviesa la CNE, la cual en tinciones de Golgi aparece como una región engrosada sin una estructura clara, está formada por dos o más prolongaciones que se extienden desde la CPE hasta la MLE, al igual que ocurre en células disgregadas de conejo (Reichenbach y Wohlrab, 1986). Algunas de las células presentan una o varias estructuras anulares entre el extremo ventricular y el soma, es decir, tramos de la prolongación que rodean zonas circulares y aparentemente laminares de la célula. En las células disgregadas no se observan las laminaciones que se han observado

en tinciones de Golgi y por microscopía electrónica que recubren los somas de las neuronas.

Se han realizado numerosos estudios sobre la morfología de las células de Müller mediante microscopía electrónica, con resultados bastante coincidentes en cuanto a la morfología general de la célula (Fine y Zimmerman, 1962 en humano; Meller y Glees, 1965 y Prada, F. y col., 1989 a y b en pollo; Miller y Dowling, 1970 en *Necturus* (anfibio); Magalhães y Coimbra, 1972 y Reichenbach y col., 1988a y b en conejo; Rasmussen, 1972 en rata; Sarthy y Bunt, 1982 en tortuga; Reichenbach y col., 1995 en tupaya (mamífero); Uga y Smelser, 1973a y Rasmussen, 1974 en especies de varias clases). Todos los autores coinciden en señalar que prácticamente todas las células de la retina se hallan recubiertas por prolongaciones o expansiones de la célula de Müller, y que los contactos sinápticos de las capas plexiformes están también rodeados por prolongaciones de estas células. El tupaya presenta peculiaridades (Reichenbach y col., 1995), pues las expansiones que rodean los somas de las células de la retina son multilamelares, sin que se conozca el significado de este hecho. En retina de mamífero (Hildebrand y Waxman, 1983; Reichenbach y col., 1988c) está descrito que la célula de Müller emite pequeñas prolongaciones que forman una especie de corona en torno a regiones de los axones de la CFNO con estructura similar a la de los nódulos de Ranvier. A estas prolongaciones se les denomina "perinodales".

1.3.3 Citología

La citología de la célula de Müller se caracteriza por la asimetría en la distribución de orgánulos, de proteínas de membrana y del citoesqueleto. Es decir, la célula presenta una distribución de ciertas moléculas y orgánulos que no es homogénea a lo largo de ella, sino que varía en relación a las capas de la retina.

1.3.3.1 La membrana plasmática

La distribución de diferentes oligosacáridos de la membrana ha sido estudiada mediante unión de lectinas específicas, empleando células disgregadas. Se detecta un gran número de sitios de unión en la región de los *microvilli* (Sarthy y col., 1981; Reichenbach y col., 1985). La bomba de Na^+/K^+ (Na^+/K^+ ATPasa) se encuentra también en mayor concentración en la región de los *microvilli* (Stirling y Sarthy, 1985), así como en las partes de la célula contenidas en las capas plexiformes (Reichenbach y col., 1988a). La 5'-nucleotidasa, otra proteína de membrana, también se distribuye asimétricamente,

encontrándose en la CNE y CPE (Kreutzberg y Hussain, 1982). En contraste, la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) se encuentra distribuida por toda la célula, desde el *microvilli* a la CFNO (Stefansson y col., 1984). Esta proteína es propia de los oligodendrocitos y, curiosamente, su expresión se ha descrito en retina humana, la cual no se mieliniza.

Mediante estudios de microscopía electrónica de réplicas de criofractura se ha estudiado la distribución de partículas intramembranas en las células de glía. En determinadas zonas de la membrana de los astrocitos, estas partículas adoptan ordenaciones regulares ortogonales (Landis y Reese, 1974). Este tipo de ordenación también se ha encontrado en la superficie de los pies vítreos de la célula de Müller de mamíferos y, en las retinas vascularizadas, en los puntos donde las prolongaciones contactan con los vasos (Raviola, 1977; Wolburg y Berg, 1987, 1988; Gotow y Hashimoto, 1989; Richter y col., 1990). También se encuentran en las Müller de peces (Berg y Wolburg, 1989) y en las de urodelos, pero no en las de anuros (Wolburg y col., 1992). En el apartado 1.3.4.3 haremos algunas consideraciones sobre su posible función.

Las células de Müller tienen uniones entre sí y con los fotorreceptores a nivel de la MLE. Las uniones más frecuentemente observadas son del tipo *zonula adherens* o uniones adhesivas (Reichenbach y Robinson, 1995). En peces, sin embargo, son uniones estrechas, y en anuros son tipo *gap* o comunicantes (Uga y Smelser, 1973a). Se ha descrito también la presencia de uniones comunicantes en las capas internas en las células de Müller humanas (Reale y col., 1978). En conejo existen uniones comunicantes entre astrocitos, oligodendrocitos y células de Müller (Robinson y col., 1993), las cuales permiten el tráfico de moléculas desde astrocitos y oligodendrocitos hacia las células de Müller, pero no en sentido inverso.

1.3.3.2 Los orgánulos intracelulares

El núcleo se sitúa en la parte media de la célula, dentro de la CNI, pero a distintos niveles dentro de ésta. Su forma general es aproximadamente elíptica, con el eje mayor paralelo al longitudinal de la célula (Rasmussen, 1972, 1974). Muchos autores destacan que tiene una forma algo irregular, como si su perfil se impresionara con la morfología de las neuronas que le rodean (Reichenbach y col., 1988a).

Las mitocondrias se distribuyen de distinta forma dependiendo de la especie. En especies con retina vascularizada las mitocondrias se concentran en los pies vítreos. Cuando

la retina está vascularizada superficialmente se encuentran por toda la célula, pero más concentradas en la mitad interna. Cuando la retina es avascular se encuentran en la parte ventricular, cerca de los *microvilli* (Uga y Smelser, 1973a; Rasmussen, 1974, 1975). Fernández y col. (1995) encontraron dos poblaciones de mitocondrias en retina de carpa, una positiva al marcaje con la proteína quinasa C (PKC) y otra negativa. Las mitocondrias PKC positivas se encuentran mayoritariamente cerca de los vasos sanguíneos.

El retículo endoplásmico liso se concentra a nivel de las capas más internas, mientras que el retículo endoplásmico rugoso, los ribosomas y el aparato de Golgi se encuentran, en general, en la zona de la CNI, en torno al núcleo (Magalhães y Coimbra 1972, 1973; Uga y Smelser, 1973a; Reichenbach y col., 1988a y b). En la porción externa de la célula se encuentran cuerpos multivesiculares, un orgánulo membranoso (Reichenbach y col., 1988a).

Las células de Müller son el principal almacén de glucógeno en la retina. Su distribución en conejo es asimétrica, encontrándose el mayor número de gránulos de glucógeno en la parte interna, y disminuyendo a medida que nos aproximamos a las capas externas (Magalhães y Coimbra, 1970). El glucógeno es más abundante en las retinas avasculares (Uga y Smelser, 1973a).

1.3.3.3 El citoesqueleto

Aunque los estudios de ultraestructura han servido para estudiar el citoesqueleto, sobre todo la distribución de los gliofilamentos, la mayor información ha sido obtenida mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estos estudios han revelado la presencia de vimentina en las células de Müller de ratón (Schnitzer y col., 1981; Dräger, 1983; Dräger y col., 1984), rata (Shaw y Weber, 1983), conejo (Schnitzer, 1985 y 1988), pollo (Lemmon y Rieser, 1983), tortuga (Gaur y col., 1988) y camaleón (Prada, F. y col., 1995). Esta proteína se expresa también en células neuroepiteliales y en las células que Reichenbach y Robinson (1995) clasifican como endimoglia. Otra proteína componente de filamentos intermedios, la desmina, también ha sido encontrada en las células de Müller (Dahl y Bignami, 1982). La proteína fibrilar ácida glial (GFAP), el filamento intermedio que se localiza en los astrocitos, ha sido demostrada en las células de Müller de la retina de varias especies de peces (Bignami, 1984; Linser y col., 1985; Jones y Schechter, 1987; Nona y col., 1989) y anfibios (*Xenopus*: Szaro y Gainer, 1988). En retina de pollo no se detectó en un primer estudio (Lemmon y Rieser, 1983), aunque estudios posteriores han confirmado su expresión (Torelli y col., 1989;

Semple-Rowland, 1991). En retina normal de mamífero hay datos contradictorios sobre la presencia de GFAP (Björklund y col., 1985), que parecen sugerir que esta proteína no se expresa en condiciones normales. Sí hay un consenso, sin embargo, sobre su presencia en retinas lesionadas o en degeneración (Bignami y Dahl, 1979; Shaw y Weber, 1983; Lewis y col., 1989; Reichenbach y col., 1992). Estos datos sobre expresión de vimentina y GFAP condujeron a Bignami (1984) a considerar la posibilidad de que los filamentos intermedios de la glía de Müller sean heteropolímeros de estas dos proteínas, variando las razones entre las dos proteínas según las especies y como respuesta a lesiones. La co-expresión de vimentina y otros filamentos intermedios no es exclusiva de las células de Müller. Por ejemplo, los astrocitos inmaduros de retina de conejo coexpresan vimentina y GFAP (Schnitzer, 1988). Las células horizontales de la retina de ratón contienen vimentina y neurofilamentos (Dräger, 1983), y en varias especies de peces GFAP y neurofilamentos (Linser y col., 1985). En astrocitos cultivados de ratón se ha demostrado que la GFAP y la vimentina copolimerizan en los mismos filamentos (Abd-El-Basset y col., 1992). Por otra parte, también algunas neuronas, en estadios tempranos de desarrollo, expresan vimentina (Bignami y col., 1982). En tinciones inmunohistoquímicas contra filamentos intermedios de la célula de Müller, la máxima intensidad de marcaje se observa en la zona de la CFNO y disminuye en capas más externas.

Además de filamentos intermedios, también se han identificado algunas proteínas asociadas a citoesqueleto (filamina o una proteína relacionada: Lemmon, 1986; gelsolina: Legrand y col., 1991, en conejo). La proteína S-100 se ha encontrado en las células de Müller de mamíferos (Cocchia y col., 1983; Kondo y col., 1983), pero no en la de pollo (Linser y Moscona, 1981).

Por último, se han obtenido varios anticuerpos que marcan componentes fibrilares de las células de Müller y que, por tanto, es presumible que sean proteínas de citoesqueleto, y cuyo patrón de expresión es distinto al de la vimentina, aunque no han sido totalmente caracterizados desde el punto de vista molecular (Dräger y col., 1984 en ratón; Lemmon, 1985 en pollo; Robinson y Dreher, 1990 en conejo; Dreher y col., 1992 en varias especies de mamíferos). Uno de estos anticuerpos es el monoclonal 3CB2 (Prada, F. y col., 1995), el cual marca intensamente toda la célula de Müller en varias especies de vertebrados. En la retina de pollo marca también los axones de las células horizontales. Se trata de un marcador de células de Müller muy temprano, ya que las marca selectivamente desde el día embrionario

7.5-8 (E7.5-8), cuando comienza su diferenciación. Esta proteína tiene un peso molecular próximo al de varios filamentos intermedios, aunque su patrón de marcaje en secciones la distingue de los filamentos intermedios y de las proteínas reconocidas por otros monoclonales descritos. Los autores sugieren que podría tratarse de una proteína asociada a filamentos intermedios. En esta tesis estudiaremos su expresión en las células de Müller a lo largo del desarrollo.

También se ha estudiado la distribución de moléculas del citoesqueleto a nivel de la MLE, la cual está formada por uniones adherentes entre las células de Müller y entre éstas y los fotorreceptores. Williams y col. (1990), en un estudio realizado en pollo encontraron a este nivel actina, miosina, alfa-actinina y vinculina.

1.3.3.4 Marcadores de la célula de Müller

Algunos de los anticuerpos que hemos mencionado en los apartados anteriores, sobre todo la vimentina, se usan como marcadores de células de Müller, tanto en secciones como en células disgregadas y en cultivos. Además de éstos, se han descrito varias enzimas específicas de las células de Müller, detectables por reacciones histoquímicas (reacciones de enzimas oxidativas: Berkow y Patz, 1964; actividad esterásica inespecífica: Bhattacharjee y Sanyal, 1975; NADH-diaforasa: Reichenbach y Wohlrab, 1983) o por anticuerpos monoclonales (glutamina sintetasa: Riepe y Noremburg, 1977; Linser y Moscona, 1979; anhidrasa carbónica: Linser y Moscona, 1981). Otra proteína identificada inmunohistoquímicamente en mamíferos es la proteína celular ácida ligante de retinal (CRALBP), que se distribuye por todo el citoplasma de la célula (Bunt-Milam y Saari, 1983). Además, se han producido anticuerpos monoclonales que marcan proteínas, algunas de ellas no caracterizadas molecularmente, que se expresan en células de glía del SNC, y que en la retina sólo se expresan en células de Müller (proteínas reconocidas por los anticuerpos Ret-G1, Ret-G2 y Ret-G3: Barnstable, 1980 en rata; 2 anticuerpos contra antígenos de membrana: Chan y col., 1984; proteína EAP-300: McCabe y Cole, 1992 en pollo). Especialmente interesante nos parece el monoclonal 2M6 (Schlosshauer y col., 1991), cuya expresión, estudiada en pollo, está restringida exclusivamente a las células de Müller, no encontrándose en ningún otro tipo celular. Se trata de un antígeno proteico del que se desconoce su función.

Una característica común a muchos de los marcadores de la célula de Müller, tanto histoquímicos como inmunohistoquímicos, es que reconocen moléculas que durante el

desarrollo comienzan a expresarse en todo el neuroepitelio y que a veces, antes de restringirse su expresión a las células de Müller, se expresan transitoriamente en neuroblastos y, en el caso de retinas vascularizadas, en astrocitos inmaduros.

1.3.4 Función

Al ser la retina una porción del SNC y la célula de Müller el único tipo de glía en muchas especies y el tipo mayoritario en el resto, esta célula cumple en ella las funciones que en el resto del SNC son llevadas a cabo por los distintos tipos de células gliales. Las funciones que clásicamente se le han adjudicado a la célula de Müller son las de soporte y aislamiento de las neuronas, así como de nutrición. Hoy en día sabemos que tienen también importancia en el mantenimiento de la homeostasia tisular, pues mantienen el pH, eliminan el exceso de K^+ y retiran los neurotransmisores liberados por las neuronas. También son importantes para el mantenimiento de la homeostasia el establecimiento y mantenimiento de la barrera hemato-retinal y la respuesta ante lesiones, procesos en los que también parece estar implicada la célula de Müller. También se piensa que la célula de Müller, como glía radial que es, puede jugar algún papel en la migración de ciertos neuroblastos de la retina. Por último, se ha descrito la existencia en la célula de Müller de un cierto número de receptores, canales y otros sistemas que sugieren fuertemente una interacción entre las células de Müller y las neuronas y viceversa, lo que por una parte contribuiría a integrar las funciones de la célula de Müller para adecuar su funcionamiento al entorno y, por otra, podría modificar la excitabilidad neuronal y/u otros procesos.

1.3.4.1 Función de soporte y aislamiento.

La primera función que se asignó a la célula de Müller fue la meramente estructural: proveer a la retina de una especie de trama interna que soporta su compleja arquitectura. También se hizo especial hincapié en su función de aislamiento de las neuronas y los contactos sinápticos entre ellas. Sin duda, las prolongaciones de las células de Müller rodean de modo casi total los somas de algunas neuronas (Ramón y Cajal, 1892), aunque no de todas. Aíslan los contactos sinápticos en las capas plexiformes (Ramón y Cajal, 1892; Meller y Glees, 1965) y también bordean los vasos sanguíneos (Kondo y col., 1983; Hollander y col., 1991). En la CFNO las vainas de mielina que se observan alrededor de algunos axones en las porciones más próximas al nervio óptico se originan a partir de las prolongaciones

internas de las células de Müller (Ladman y Soper, 1962; Hughes y LaVelle, 1975; Prada, F. y col., 1989b).

1.3.4.2 Función nutritiva y metabólica

Clásicamente se le ha adjudicado a la célula de Müller un importante papel nutricional, por el hecho de poseer abundante *microvilli* (Uga y Smelser, 1973a), por ser el principal almacén de glucógeno de la retina (Magalhães y Coimbra, 1970), y por haberse descrito la existencia de vesículas pinocíticas en su superficie (Prada, F. y col., 1989b). También se ha demostrado la presencia de la glucógeno fosforilasa, esencial en la movilización de las reservas de glucógeno, por medios histoquímicos (Ohanian, 1972) e inmunohistoquímicos (Pfeiffer y col., 1994). Además, se ha demostrado la existencia de las proteínas GLUT1 (Mantych y col., 1993) y GLUT2 (Watanabe y col., 1994), transportadoras de glucosa por difusión facilitada en células de Müller de retinas humanas y de rata respectivamente. Puede también desempeñar una importante función en el metabolismo de la vitamina A, pues es la única célula de la retina neural en la que se localiza la proteína celular ácida ligante de retinal (Bunt-Milam y Saari, 1983; Saari y col., 1984) y la proteína celular ligante de retinol (Bok y col., 1984). Hoy es bien conocido que la vitamina A es una molécula esencial en el proceso de fototransducción.

1.3.4.3 Mantenimiento de la homeostasia retinal

La célula de Müller juega un papel preponderante en la homeostasia de la retina, por la **eliminación del exceso de K^+** del espacio extracelular. Newman (1984, 1985 a y b) demostró en retina de salamandra que la célula de Müller es casi exclusivamente permeable al K^+ , y que el mayor número de canales para este ion se concentran en el pie vítreo. Basándose en estos hallazgos, Newman y col. (1984) propusieron que las células de Müller toman del espacio extracelular el exceso de K^+ generado por la actividad neuronal y lo eliminan al vítreo. A este mecanismo lo denominaron *spatial siphoning*, ya que el exceso de K^+ es expulsado del tejido (Karwoski y col., 1989). Los canales de K^+ que se encontraron en salamandra son del tipo *inward rectifiers* (Brew y col., 1986; Newman, 1993), especialmente adecuados para la función propuesta, aunque también existen canales de K^+ tipo A (rápidamente inactivantes) y canales dependientes de Ca^{2+} (Newman, 1985b). Resultados similares se han obtenido en células de Müller de tortuga (Conner y col., 1985)

y de rana (Skatchkov y col., 1995). Este mecanismo también se ha estudiado en mamíferos (Reichenbach y Eberhardt, 1986), donde es similar, aunque la situación es más compleja. Por una parte, se detectan diferencias entre retinas vasculares y avasculares (Newman, 1987; Reichelt y Panicke, 1993) y, por otra, se ha identificado un mayor número de tipos de canales de K^+ , no homogéneamente distribuidos en la célula (Nilius y Reichenbach, 1988; Reichelt y Panicke, 1993). Los grupos de partículas ordenados ortogonalmente que mencionamos en el apartado 1.3.3.1 han sido relacionados con el control de la concentración de K^+ extracelular y se piensa que pueden representar canales de K^+ (Hatton y Ellisman, 1982; Wolburg y Berg, 1987), ya que se concentran en el pie vítreo. Otros autores, sin embargo, señalan que la relación entre estas partículas y el tamponamiento del K^+ no es tan evidente (Berg y Wolburg, 1989; Wolburg y col., 1992), y que estos grupos de partículas podrían cumplir otras funciones, quizás proporcionando cierta estabilidad a la membrana (Gotow y Hashimoto, 1989).

La célula de Müller interviene en la **retirada de los neurotransmisores** liberados por la transmisión sináptica, proceso importante para limitar la excitabilidad neuronal. A este respecto, recuérdese que las prolongaciones de la célula de Müller rodean los contactos sinápticos en las capas plexiformes (Meller y Glees, 1965). Las células de Müller poseen sistemas de captación de varios neurotransmisores y/o neuromoduladores. Se han descrito estos mecanismos para el glutamato (Ehinger, 1977; Casper y col., 1982; Brandon y Lam, 1983; Brew y Attwell, 1987; Barbour y col, 1988, 1991; Bouvier y col., 1992; Amato y col., 1994), para el GABA (Ehinger, 1977; Sarthy, 1982, 1983) y para la taurina (Ehinger, 1973; Lake y col., 1978; Schulze y Neuhoff, 1983). También se han encontrado sistemas enzimáticos para la inactivación y/o degradación de glutámico (Riepe y Noremburg, 1977; Sarthy y Lam, 1978; Linser y Moscona, 1979; Trachtenberg y Packey, 1983; Linser y col., 1984), GABA (Hyde y Robinson, 1974; Moore y Gruberg, 1974; Sarthy y Lam, 1978) y acetilcolina (Sarthy y Lam, 1978).

Otro factor importante en la homeostasia de un tejido es el **mantenimiento del pH**. Linser y Moscona (1981) demostraron inmunohistoquímicamente que la expresión de anhidrasa carbónica está restringida en retina de pollo a la célula de Müller, lo que indica la importancia de esta célula en el equilibrio ácido-base de la retina. Como es sabido, esta enzima cataliza la reacción de hidratación del CO_2 para formar ácido carbónico ($CO_2 + H_2O \rightleftharpoons CO_3H_2$), que se disocia en H^+ y HCO_3^- , eliminándose así el exceso de CO_2 generado en

el metabolismo de las células de la retina. El funcionamiento de esta enzima fue comprobado por Newman (1994) en células de Müller de salamandra recién disgregadas. Dado que la célula posee en el pie vítreo un cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Newman, 1991), el ion bicarbonato sale al humor vítreo, de modo similar a lo que ocurre con el K^+ . Se postula también la existencia de un intercambiador de Na^+/H^+ , que sacaría el H^+ al humor vítreo, consiguiéndose así el mantenimiento del equilibrio ácido-base de la retina.

También relacionada con la homeostasia está la capacidad de inducir la **formación de la barrera hemato-retinal** en las retinas vascularizadas; según algunos autores (Tout y col., 1993; estudio realizado en conejo), las células de Müller pueden inducir la formación de la barrera, aunque otros autores (Small y col., 1993; estudio realizado en cobaya) no han observado tal inducción.

Hay indicios de que la célula de Müller puede estar implicada en **procesos de respuesta a lesiones** en la retina, puesto que tras una lesión hay cambios en la expresión de moléculas de citoesqueleto (Bignami, 1984; Humphrey y col., 1993; Dabin y Barnstable, 1995; Huxlin y col., 1995), así como de la enzima glutamina sintetasa y de la proteína del protooncogén Bcl-2 (Grosche y col., 1995), ésta con presunto papel antioxidante en casos de daño tisular. Además la célula de Müller puede producir NO (Goureau y col., 1994; Liepe y col., 1994), una de cuyas posibles funciones es la participación en procesos de defensa o de respuesta a lesiones.

1.3.4.4 Papel en la migración celular durante el desarrollo de la retina

Diversos autores (Bhattacharjee y Sanyal, 1975; Meller y Tetzlaff, 1976; Prada, F. y col., 1989b; Reichenbach y col., 1992, 1994), sugieren que las células de Müller pueden jugar durante el desarrollo de la retina un papel similar al adjudicado a la glía radial en el desarrollo del SNC: especie de raíles a los que se adhieren determinados neuroblastos para emigrar (Rakic, 1972). Es notoria la semejanza entre los glioblastos de Müller, en sus primeros estadios, y la glía radial de otras zonas del SNC en desarrollo. En la retina de pollo, como veremos más adelante, las células de Müller comienzan a salir del ciclo celular después que han comenzado a salir las células horizontales y amacrinas (Kahn, 1974; Prada, C. y col., 1991), las cuales son las que realizan emigración libre en la retina. De hecho, la mayoría de las células de Müller abandonan el ciclo después de E6 (Prada, C. y col., 1991), cuando ya han emigrado y alcanzado las posiciones definitivas la mayoría de las células

amacrinas (Prada, C. y col., 1987). Por lo tanto, no está claro que en la retina las células de Müller jueguen algún papel en la emigración de los neuroblastos. Jueguen o no un papel en la migración, sí pueden interactuar con los otros tipos celulares de la retina a lo largo del desarrollo. Así, en cultivos heterotípicos de retina de rata los bastones tienen una marcada preferencia a crecer neuritas sobre las células de Müller, y no sobre otros tipos celulares (Kljavin y Reh, 1991).

1.3.4.5 Mecanismos de comunicación con las neuronas

En la célula de Müller se han descrito varios tipos de canales y receptores que podrían servir como mecanismos de comunicación entre neuronas y glía o como sensores de actividad neuronal. El glutámico es captado por medio de un intercambiador electrogénico e implica movimiento de grupos OH^- , lo que hace aumentar el pH extracelular y disminuir el intracelular. Este cambio de pH, según Bouvier y col. (1992) podría ser una señal para las neuronas y/o las células de Müller. En células disociadas de salamandra (Schwarz, 1993) y en células cultivadas de pollo (López-Colomé y col., 1993) existen, además de mecanismos de transporte, receptores para el glutámico de tipo metabotrópico, que promueven la activación de la proteína quinasa C, la hidrólisis de fosfoinosítidos y la entrada de Ca^{2+} . Uno de los efectos de la entrada de Ca^{2+} es el aumento de la permeabilidad de la célula al K^+ . Así pues, la propia actividad neuronal podría modular la permeabilidad de la célula de Müller a este ion. En un elasmobranquio -la raya- se ha demostrado la existencia de receptores para GABA, posiblemente del tipo GABA_A , que abren canales de Cl^- (Malchow y col., 1989). En mamíferos, Biedermann y col. (1995) han encontrado receptores para dopamina (D_2). Los autores señalan que la adición de agonistas de estos receptores hacen disminuir la permeabilidad al K^+ , lo que a su vez podría modificar la excitabilidad de las neuronas vecinas, al modificarse el mecanismo de tamponamiento del K^+ . En células de pollo cultivadas varios neuropéptidos que se encuentran en la retina (glucagón y péptido intestinal vasoactivo) hacen aumentar la concentración de AMP cíclico (Koh y col., 1984). En salamandra se ha descrito que las catecolaminas estimulan una corriente eléctrica hacia dentro (Henshel y Miller, 1992), aunque se desconoce si se produce por un mecanismo de transporte electrogénico, como el que existe para el glutamato, o por activación de canales iónicos. En células de Müller humanas cultivadas se han encontrado, por vez primera en glía, receptores NMDA, cuya activación por glutamato promueve la proliferación de las células en cultivo

(Uchiyori y Puro, 1993). No se ha descrito proliferación de células de Müller adultas, por lo que se desconoce el significado de estos receptores en condiciones fisiológicas. Señalaremos que otras sustancias, como el factor básico de crecimiento de fibroblastos, la interleukina 2 y el factor de crecimiento nervioso (Small y col., 1991; Ikeda y Puro, 1994) tienen este mismo efecto *in vitro*.

La concentración intracelular de Ca^{2+} en la célula de Müller puede variar, bien por su entrada a través de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje descritos por Newman (1985b), que se abren en caso de alta concentración extracelular de K^+ , o bien por liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares por acción de ciertas drogas como cafeína y rianodina (Keirstead y Miller, 1995). Esto podría servir para potenciar la expulsión de K^+ al vítreo por canales dependientes de Ca^{2+} (Newman, 1985b) o para inducir determinados cambios en la célula, dada la importancia del Ca^{2+} como mensajero intracelular. Cuando la liberación es de almacenes intracelulares, en medio libre de Ca^{2+} , el incremento de concentración intracelular comienza en el extremo ventricular y continúa, propagándose como una onda, hasta el polo vítreo. En células de Müller humanas cultivadas se han encontrado canales para Ca^{2+} y otros cationes mono y divalentes activados por estiramiento (Puro, 1991). No se han descrito en células disgregadas ni *in situ*, pero se postula que en caso de aumento de volumen de la célula, el ingreso de Ca^{2+} podría activar canales de K^+ dependientes de este catión, con lo que se expulsaría K^+ acompañado por agua. En algunas células de Müller de mamíferos como gato y perro, aunque no en otras como conejo y cobaya, se ha descrito la existencia de canales de Na^+ dependientes de voltaje, similares a los neuronales (Chao y col., 1993). Hay indicios de que podrían estar localizados en las prolongaciones perinodales (Chao y col., 1994). Estos canales, asumiendo esta localización, podrían funcionar como sensores de la actividad neuronal.

Las células de Müller liberan sustancias neuroactivas en determinadas situaciones. Así, despolarizaciones causadas por elevación de la concentración del K^+ extracelular o por efecto de veratridina promuevan liberación de GABA mediada por aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , lo que podría modular la actividad de células cercanas (Sathya, 1983). Faff-Michalak y col. (1994) han descrito liberación de taurina por la célula de Müller en respuesta a varios tóxicos. Apuntan la existencia de un mecanismo protector que podría limitar aumentos de volumen más allá de los límites fisiológicos, quizá influyendo la actividad de las neuronas de los alrededores. Se sabe que el volumen de la célula de Müller aumenta

en respuesta a alta concentración de K^+ y a perfusión con glutamato (Van Harreveld, 1982). En células de Müller de pollo se ha encontrado expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa (Goureau y col., 1994; Liepe y col., 1994). El NO puede funcionar como molécula citotóxica o citostática en procesos de defensa, o bien como mensajero, extra o intracelular.

En retinas vascularizadas puede haber comunicación entre la célula de Müller y otros tipos de glía de la retina, como es sugerido por la presencia de uniones tipo *gap* entre astrocitos y células de Müller (Robinson y col., 1993).

Un claro ejemplo de interacción entre neuronas y células de Müller es la expresión de la glutamina sintetasa. Esta enzima no se expresa cuando se impiden estas interacciones (Linser y Moscona, 1979; Linser y Perkins, 1987; Grosche y col., 1995). Se ha visto también que células de Müller cultivadas en ausencia de neuronas, o *in situ* tras la eliminación de células ganglionares, expresan Thy-1 (Dabin y Barnstable, 1995), lo que sugiere que las células ganglionares podrían inhibir la expresión de esta molécula en condiciones normales.

1.4 DIFERENCIACION DE LA CELULA DE MULLER

El desarrollo de la retina ocurre, al igual que el del resto del SNC, en varias etapas sucesivas en el tiempo aunque solapantes: 1) proliferación de las células neuroepiteliales, 2) producción de los distintos tipos de neuronas y glía (neurogénesis y gliogénesis), es decir, salida del ciclo celular de los distintos precursores (neuroblastos y glioblastos), 3) emigración de los neuroblastos hacia sus capas definitivas, 4) desarrollo de las formas definitivas, 5) sinaptogénesis, 6) muerte celular y 7) síntesis y liberación de neurotransmisores. El estudio en profundidad de la morfogénesis de la célula de Müller requiere una revisión detallada de las etapas de proliferación, neurogénesis y gliogénesis.

1.4.1 Proliferación: el neuroepitelio de la retina

El neuroepitelio de la retina es un epitelio de tipo columnar pseudoestratificado en el cual las células realizan ciclos de división durante los primeros estadios embrionarios. En cada ciclo, duplican su material genético en las proximidades del vítreo y realizan la mitosis en posición adyacente al ventrículo. Así, en cada ciclo celular el núcleo se mueve entre las dos limitantes del neuroepitelio hasta que las células hijas se transforman en neuroblastos o glioblastos (Sauer, 1935; Sauer y Walker, 1959; Sidman y col., 1959; Fujita, 1963).

Ramón y Cajal (1892) describió las células neuroepiteliales de la retina como células fusiformes cuyas prolongaciones alcanzan las dos limitantes. No obtuvo más información por la falta de éxito de la tinción en los embriones más jóvenes. A partir de 1970 se realizaron estudios que pretendían relacionar la forma de las células neuroepiteliales con la fase del ciclo en la que se hallan, empleando la técnica de tinción de Golgi y la reconstrucción de cortes seriados para el microscopio electrónico. Hinds y Ruffett (1971) y Hinds y Hinds (1974) fueron los primeros en realizar un estudio morfológico y ultraestructural de las células neuroepiteliales en el ciclo de división celular. Como material emplearon vesícula cerebral y retina de ratón de 13 días de gestación. Concluyeron que la forma de las células neuroepiteliales es característica de la fase del ciclo celular en la que se hallan, proponiendo un esquema que muestra la forma de las células neuroepiteliales en las distintas fases del ciclo celular (figura 1.12).

Prada, C. y col. (1981), en retinas embrionarias de pollo impregnadas con el método de Golgi, encontraron células con formas monopolares, conectadas al ventrículo y con el

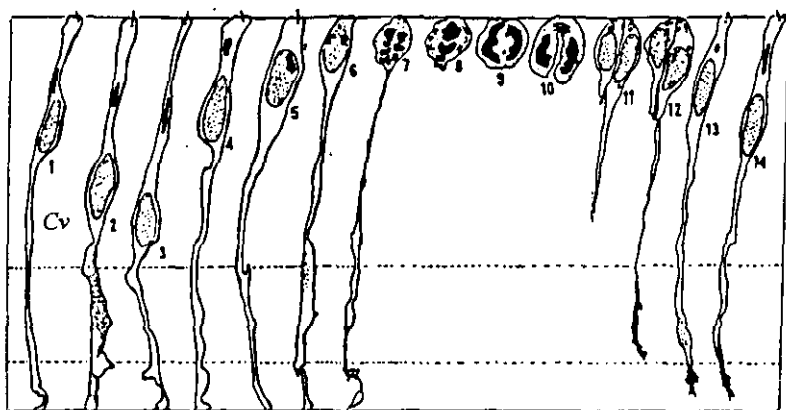


Fig. 1.12 (Hinds y Hinds, 1974)

Reconstrucciones de una muestra representativa de la variedad de células neuroepiteliales de la retina de ratón en E13. CV: capa ventricular; 1 y 2: células en interfase; 3, 4, 5, 6: células en profase; 7: célula en prometafase; 8: célula en metafase; 9: célula en anafase; 10: telofase temprana; 11 y 12: interfase temprana; 13 y 14: células en interfase.

núcleo en posiciones variables dentro del neuroepitelio. Estas formas, que no habían sido encontradas en los anteriores estudios, se asignaron a la fase G_2 , en contraposición a las formas bipolares anteriormente asignadas a esa fase. En base a estos resultados elaboraron un esquema distinto del ciclo celular. La figura 1.13 muestra los resultados obtenidos por Prada, C. y col. (1981) y Prada, C. y Ramírez (1983) en retinas de embrión de pollo entre los días 2.5 y 8.5 del desarrollo embrionario (E2.5 - E8.5). Para cada día de desarrollo muestran los tipos celulares encontrados. En cada dibujo de los distintos estadíos figuran en la parte izquierda las células neuropiteliales con la forma que adoptan en cada fase del ciclo celular (Mitosis, G_1 , S y G_2), y en la parte derecha, los neuroblastos y glioblastos con las morfologías que adoptan al salir del ciclo celular.

Desde E2.5 hasta E4.5 se observan células en todas las fases del ciclo junto con una población de células que han dejado el ciclo proliferativo para diferenciarse en neuroblastos de células ganglionares. Las células que realizan la mitosis están situadas en el borde ventricular del neuroepitelio y tienen forma redondeada y regular. Las células en G_1 emiten una prolongación con un cono de crecimiento que llega a alcanzar la limitante vítrea. El núcleo, al mismo tiempo, se desplaza hacia la limitante vítrea y al llegar a ésta sería cuando la célula entraría en la fase S, duplicando así su material genético. Finalmente, durante G_2 , las células adoptan forma monopolar, conectada sólo al ventrículo, y vuelven a la superficie ventricular para realizar de nuevo la división.

A partir de E6, la zona de síntesis de DNA se aleja de la limitante vítrea (Fujita,

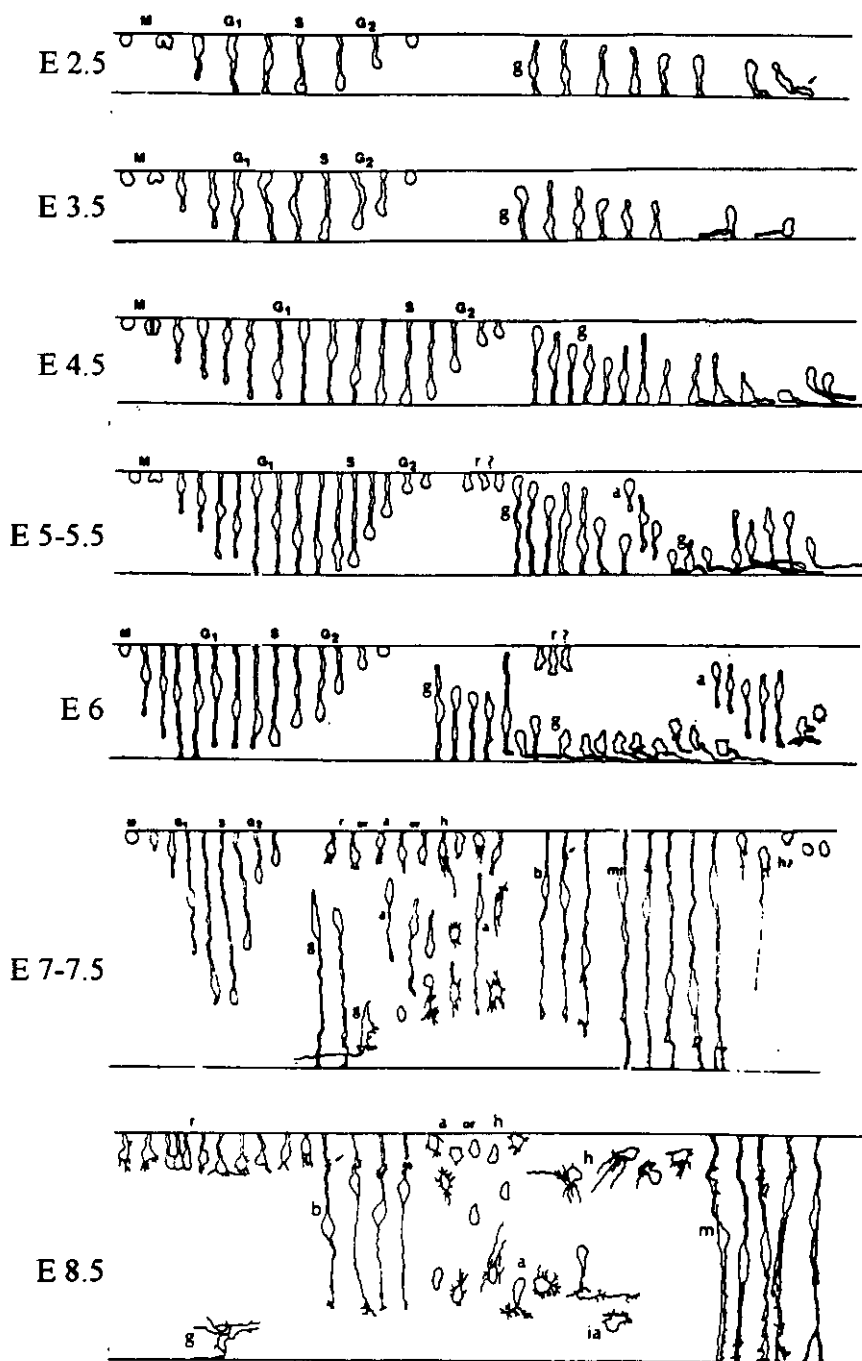


Figura 1.13 (Prada, C. y Ramírez, 1983)

Dibujos a cámara clara de los tipos celulares encontrados en la retina de pollo entre los 2.5 y los 8 días de incubación. Para cada día, la línea superior representa la superficie ventricular, y la inferior, la vítreo. M, G₁, S y G₂ indican las fases del ciclo celular.

g: neuroblasto de célula ganglionar; r?: presunto neuroblasto de fotorreceptor; a: neuroblasto de amacrina; h: neuroblasto de horizontal; b: neuroblasto de bipolar; m: glioblasto de Müller; ia: neuroblasto de amacrina invertida; flecha en A: axon creciendo de un neuroblasto de ganglionar; flechas en F y G: zona de emisión de dendritas de neuroblasto de bipolar.

1963), de la cual queda separada por la capa de axones emitidos por los neuroblastos de las células ganglionares. Este alejamiento de la zona de síntesis aumenta a medida que avanza el desarrollo. Por otra parte, mientras que entre E2.5 y E4.5 sólo se observan células neuroepiteliales y neuroblastos de células ganglionares, en días posteriores aumentan los tipos de neuroblastos identificables, y en E6.5 se identifican morfológicamente los primeros precursores de las células de Müller.

A partir de E8.5 apenas se observan formas de células en ciclo en retina central, la mayoría de los neuroblastos ocupan su lugar definitivo, se distinguen bien las distintas clases de neuronas en cada capa nuclear y ya pueden distinguirse las prospectivas capas plexiformes.

1.4.2 Neurogénesis y gliogénesis en la retina

Como hemos visto en el apartado anterior, en la retina de pollo hay una secuencia de aparición de neuroblastos y glioblastos. En base a la aparición de las formas de las distintas clases de células se podría obtener un calendario aproximado de neurogénesis y gliogénesis en la retina. Así, en base a la figura 1.13 podríamos decir que algunos precursores de las células de Müller dejan el ciclo celular antes de E7. Esto es, sin embargo, una aproximación, como veremos más adelante, pues transcurre un tiempo desde que los glioblastos dejan el ciclo celular hasta que pueden ser identificados morfológicamente. Por ésto, el momento del desarrollo en el que las células neuroepiteliales precursoras de las células de Müller dejan el ciclo celular para diferenciarse ha sido un tema controvertido durante muchos años. Así, Berkow y Patz (1964), mediante técnicas histoquímicas, y Morest (1970) mediante el método rápido de Golgi concluyeron que en el conejo estas células abandonan el ciclo después que los precursores de todas las neuronas de la retina. Por otra parte, los trabajos de microscopía electrónica de Uga y Smelser (1973b) en la retina del conejo y de Kuwabara y Weidman (1974) en la de rata, junto con los de histoquímica de Bhattacharjee y Sanyal (1975) en ratón indicaron, por el contrario, que son las primeras células que aparecen en la retina. Fue Kahn (1974) quien abordó de manera técnicamente fiable el estudio del calendario de génesis de las células de la retina del pollo, marcando radiactivamente el ADN de las células en ciclo y estudiando las autorradiografías de secciones de 10µm de grosor de retinas de los distintos estadios. Esta técnica es la única que permite obtener resultados fiables sobre el calendario de salida del ciclo de los diferentes tipos celulares de un tejido, siempre que se puedan identificar sus núcleos en los autorradiogramas. Sin embargo, Kahn no llegó a una conclusión

fiable sobre la fecha de nacimiento de las células de Müller, debido a que en secciones no se puede distinguir qué núcleos de la CNI corresponden a células de Müller y cuales a células bipolares, y a que no utilizó de manera sistemática en el análisis de sus resultados el concepto de que en un sistema de marcaje acumulativo, como el empleado en su trabajo, los núcleos no marcados corresponden a células que han abandonado el ciclo. Kahn (1974) concluyó que las células de la capa bi-Mü (los dos tercios más externos de la CNI, menos la fila más externa de núcleos de esta capa, que corresponde a las células horizontales) se generan las últimas de todas las células de la retina del pollo. Prada, C. y col. (1991), usando la técnica de autorradiografía en secciones seriadas de retina y en extensiones de células disgregadas de diferentes estadios de desarrollo, y mediante un estudio sistemático del número de núcleos no marcados por sectores y áreas de la retina, obtuvieron resultados muy diferentes. Mediante el estudio de los autorradiogramas de secciones, determinaron el momento en que deja el ciclo cada tipo celular, que no es el mismo en toda la retina, ya que unas áreas van más adelantadas que otras en este proceso, y dentro de la misma área no todas las células de un tipo dejan el ciclo celular simultáneamente. También mostraron que, salvo al principio y al final del período de neurogénesis se producen varios tipos celulares simultáneamente en cada área. El área donde comienza la neurogénesis, y que va siempre por delante, es una región situada dorsalmente con respecto a la cabeza del nervio óptico y, por tanto, ligeramente temporal (figura 1.14 A). Partiendo de esta área de referencia se observan tres gradientes espaciales de mayor a menor grado de neurogénesis: de dorsal a ventral, de temporal a nasal y de central a periférico. Por ésto, al hablar del calendario de neurogénesis o gliogénesis, es necesario especificar la región de la retina y no se puede referir de ninguna manera a la retina en general. En la figura 1.14 B mostramos una gráfica con los resultados obtenidos por estos autores en la región temporal-central-dorsal de la retina (aproximadamente, la zona sombreada en A). El calendario de neurogénesis de las células bipolares y de las células de Müller lo obtuvieron en autorradiografías realizadas sobre extensiones de células disociadas de retinas completas, en las cuales se pueden identificar los tipos celulares (figura 1.14 C). Demostraron en retina de pollo que las células de Müller no son las últimas células de la retina en salir del ciclo celular, sino que comienzan a abandonarlo muy pronto (E5) y terminan en E11 en toda la retina (véase la figura 1.14 C). Las últimas células en generarse no son ellas, sino las células bipolares, que dejan el ciclo en E12. Por lo tanto, las células de Müller del pollo tienen un periodo de gliogénesis muy largo, seis días, y aunque no son las primeras en

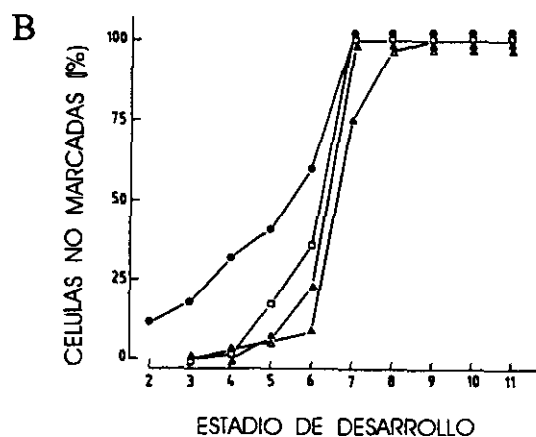
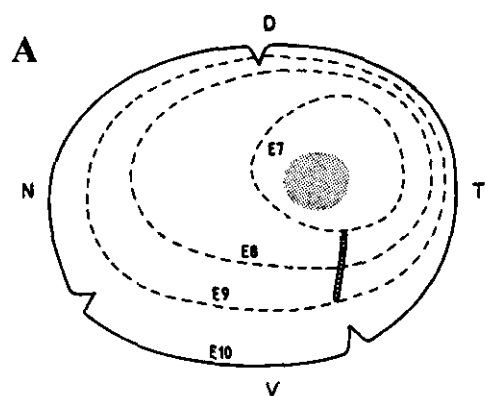
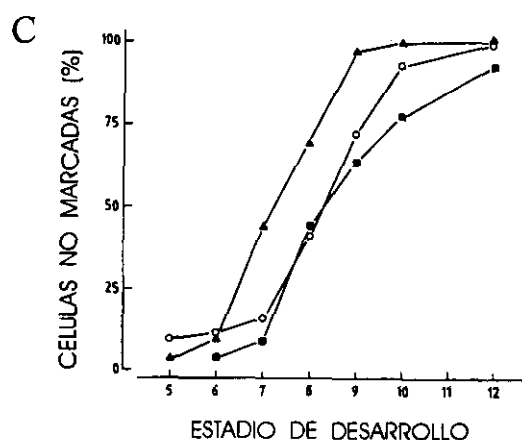


Figura 1.14 (Prada, C. y col., 1991)

Patrones espacial y temporal de neurogénesis en la retina del pollo. **A:** Esquema de una retina en plano mostrando, a modo de ejemplo, la progresión de la neurogénesis de los fotorreceptores. La zona rayada indica el nacimiento del nervio óptico. **D, V, T y N** marcan los cuadrantes dorsal, ventral, temporal y nasal, respectivamente. Las líneas discontinuas rodean las zonas en las que se alcanza el 100% de neurogénesis para el estadio indicado en su interior. **B:** Patrón temporal de neurogénesis de células ganglionares (círculo), amacrinas (triángulo abierto), horizontales (cuadrado) y fotorreceptores (triángulo relleno), averiguado en autorradiografías de secciones, aproximadamente



a nivel del área sombreada en **A**. **C:** Patrón espacial de salida de ciclo de fotorreceptores (triángulo), células bipolares (cuadrado) y células de Müller (círculo), determinado en autorradiografías de disgregaciones celulares de la retina completa. Compárese el patrón que se obtiene para los fotorreceptores con estos dos métodos.

comenzar a generarse, sí lo hacen pronto en el desarrollo.

Los estudios de marcaje de líneas celulares con retrovirus, realizados por Turner y Cepko (1987) y Turner y col. (1990) en retina de roedores, así como los de Wetts y Fraser (1988), Wetts y col. (1989) y Holt y col. (1988) en retinas de anfibios, indican que las células de la retina derivan de precursores multipotentes, y que las células se comprometen en el último ciclo de división, o en el momento de la separación de las dos células hijas. Estos estudios de linaje celular estaban encaminados a averiguar las relaciones ontogenéticas entre los distintos tipos de células, es decir, el árbol genealógico de las células de la retina, y han intentado responder a la pregunta de si todos los tipos de células de la retina, neuronas y glía incluidas, se generarían a lo largo de todo el desarrollo a partir de una población homogénea de células neuroepiteliales multipotentes o, por el contrario, si las células

neuroepiteliales de los estadios iniciales se comprometerían formando líneas celulares con capacidad proliferativa para cada tipo de células de la retina. Esto último implicaría la existencia de poblaciones diferentes de células neuroepiteliales, de modo similar a como ocurre en la médula ósea con la diferenciación de las células sanguíneas (Alberts y col., 1992). Los resultados de los experimentos con retrovirus apoyan, por lo tanto, la idea de que las células neuroepiteliales son pluripotentes al menos durante parte del periodo de neurogénesis. Los trabajos de Barnstable y col. (1985) en retina de rata y McLoon y Barnes (1989) en retina de pollo, mediante anticuerpos monoclonales, muestran que la expresión de marcadores de células diferenciadas comienza en la célula neuroepitelial en posición adyacente al ventrículo, lo que indica que, al menos para algunos tipos celulares, la determinación ocurre durante la mitosis del último ciclo de división o inmediatamente después, pero antes de que los neuroblastos comiencen a emigrar a sus posiciones definitivas.

Experimentos realizados en retina de peces (Negishi y col., 1982) y anfibios (Reh y Tully, 1986; Reh, 1987), especies en las cuales hay producción de células a lo largo de toda la vida, evidencian una influencia ambiental en el proceso de neurogénesis. En estos experimentos se muestra que la destrucción selectiva de determinados tipos celulares estimula su producción. Entre los factores ambientales que podrían intervenir en este proceso estarían señales mediadas por interacciones celulares (Harris y Messersmith, 1992), por interacciones de las células con la matriz extracelular (Hunter y col., 1992) o por unión de factores solubles a sus receptores, que pueden actuar como potenciadores de la capacidad proliferativa del neuroepitelio de la retina (Anchan y col., 1991) o como inductores de la producción de determinados tipos celulares (Parck y Hollenberg, 1989; Pittack y col., 1991; Guillemot y Cepko, 1992; Kelley y col., 1994). Se desconoce si la gliogénesis está influenciada por factores ambientales.

Sin embargo, recientemente han aparecido trabajos que cuestionan la idea de que las células neuroepiteliales son una población homogénea de células multipotentes a lo largo de todo el desarrollo, capaces de diferenciarse en cualquier tipo de célula de la retina. Prada, C. y col. (1991) han demostrado en el pollo que al principio de la neurogénesis sólo se producen células ganglionares y al final sólo células bipolares, lo cual cuestiona la multipotencialidad de las células neuroepiteliales en estos momentos del desarrollo. Otros trabajos proponen la posibilidad de la existencia de sublinajes, es decir, precursores cuya potencialidad se restringe a uno o varios tipos celulares (McLoon y Barnes, 1989). Según este

inicial de células epiteliales daría lugar a precursores comprometidos a dar uno o varios tipos celulares. Este punto de vista se ve apoyado por resultados de Watanabe y Raff (1992), quienes demuestran que células neuroepiteliales de diferentes estadios de desarrollo se comportan de diferente manera en las mismas condiciones de cultivo, lo que indica que las células van cambiando a lo largo del desarrollo, es decir, su potencial se iría restringiendo. También Lillien y Cepko (1992) observaron cambio en la respuesta de células neuroepiteliales a determinados factores de crecimiento. Hernández-Sánchez y col. (1994) descubrieron un antígeno, denominado PM1, cuya expresión está restringida a una subpoblación de células neuroepiteliales, lo que indica que las células neuroepiteliales no son una población homogénea. Reichenbach y col. (1994), basándose en cálculos de la abundancia relativa de distintos tipos celulares en la retina de mamíferos, así como en los calendarios de neurogénesis averiguados por autorradiografía y en los hallazgos de trazado de linaje por retrovirus, proponen dos fases de producción de tipos celulares, y por lo tanto la existencia de diferentes linajes para distintos tipos celulares. Habría uno o varios linajes que darían lugar a las células ganglionares, las horizontales, parte de las amacrinas y los conos, y otro linaje que daría origen, más tardíamente, a los bastones, las células bipolares, parte de las amacrinas y las células de Müller. Estos autores apuntan la hipótesis de que una célula precursora del segundo linaje daría lugar a una sola célula de Müller y cantidades fijas para cada especie de los otros tipos celulares. En la retina de marsupiales la existencia de dos fases de neurogénesis ha sido claramente demostrada en 2 especies distintas (Harman y Beazly, 1987, 1989; Harman y col., 1992).

1.4.3 Morfogénesis de la célula de Müller

El desarrollo de las células de Müller también fue estudiado por Ramón y Cajal (1892, figura 1.15). En los primeros estadios describe los glioblastos de Müller como células elongadas y fusiformes con somas ovales. Las prolongaciones alcanzan las dos limitantes y se unen a ellas por engrosamientos. En este primer estadio los somas están dispersos por toda la retina excepto la CCG y la CFNO (figura 1.15 A); sin embargo, cuando progresa el desarrollo, los somas se desplazan hacia el centro de la CNI (figura 1.15 C). Los contornos se van haciendo más irregulares y su final vítreo aparece bifurcado en algunas células (figura 1.15 B). Por último, las células crecen en grosor y emiten expansiones laminares. El extremo de la prolongación ventricular se transforma en un disco del que salen finas prolongaciones

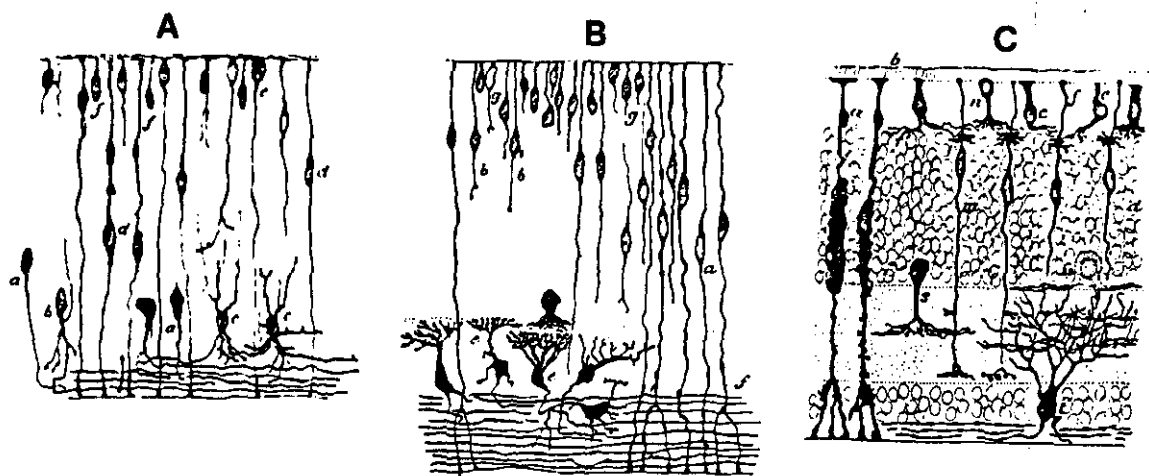


Figura 1.15 (Cajal, 1892)

Dibujos de cortes de retinas embrionarias de distintos vertebrados; A: embrión de ratón en el estadio de 15mm. Los glioblastos están marcados con d; B: embrión de perro en el estadio de 9 cm. Glioblastos marcados con f; C: embrión de pollo en E14. Glioblastos marcados con a. Aunque los dibujos pertenecen a especies distintas, dan una idea de la transformación de las células de Müller en los vertebrados.

que penetran entre los precursores de los fotorreceptores. En la CNE hay unas expansiones laminares cuya aparición es precedida por la presencia de una masa protoplásmica redondeada u oval, de la que Ramón y Cajal afirma que es una reserva de la que se desarrollan las posteriores expansiones laterales (figura 1.15 C). Por último, afirma que el haz de prolongaciones vítreas presentes en las células de reptiles y aves se origina por fisura longitudinal de la prolongación vítrea desde la CCG.

El desarrollo postnatal de las células de Müller del conejo ha sido estudiado a nivel morfológico por Reichenbach y Reichelt (1986) mediante el uso de una técnica de disgregación celular que preserva la morfología de las células de Müller. En el momento del nacimiento (P1) las células de Müller tienen la apariencia de las células neuroepiteliales. Poseen un soma pequeño y alargado del que parten dos prolongaciones largas y finas hacia las dos limitantes, a las que se unen con pies de conexión. Al avanzar la diferenciación, las células se hacen más gruesas. A partir de P10 se desarrollan pequeñas ramificaciones en la parte de la célula que está dentro de las capas plexiformes y la prolongación ventricular se divide en ramificaciones que presumiblemente formarán la red de expansiones laminares que envuelven los somas de los fotorreceptores en la retina adulta. También tras este día se observan pies de conexión vítreos múltiples en las células de la retina central. El hecho de que sea a partir de P10 cuando se empiezan a emitir ramificaciones es relacionado por los

autores con la aparición de actividad eléctrica en la retina y el subsiguiente aumento en la concentración de K^+ , especialmente en las capas plexiformes. Este aumento en la concentración de K^+ induciría la emisión de prolongaciones por diversos mecanismos que llevarían al aislamiento de los contactos sinápticos por medio de las prolongaciones gliales.

Meller y Glees (1965) estudiaron el desarrollo de la célula de Müller del pollo mediante microscopía electrónica de transmisión. Encontraron que en E6 gran parte de las células son neuroepiteliales sin diferenciar. En E9 ya se pueden distinguir los glioblastos de las células de Müller. Su porción externa se une con la de las células adyacentes mediante uniones especializadas de membrana. En este estadio aún hay pocas mitocondrias en la porción externa. Estas se concentran sobre todo a nivel de la CPI, aunque hacia E18 se sitúan definitivamente en la porción externa. Al mismo tiempo, de esta región externa surge *microvilli*, que se hace más numeroso con el tiempo. En E15 se observan numerosas prolongaciones de las células de Müller dentro de la CPE que penetran entre las prolongaciones externas de las células bipolares y de otras células que participan en la formación de esta capa; sin embargo, todavía no se observan prolongaciones entre los contactos sinápticos entre fotorreceptores y células bipolares. En E17 se observa un aumento de la cantidad del material fibrilar, aparecen varios complejos de Golgi y retículo endoplásmico rugoso. Además, las células de Müller aíslan los complejos formados por los contactos sinápticos entre los fotorreceptores y las células bipolares. En E19 los somas de los fotorreceptores están totalmente aislados por las prolongaciones de las células de Müller. Este aislamiento de las células nerviosas y sus contactos sinápticos por las prolongaciones de las células de Müller se observa también parcialmente en la CNI, CPI y CCG.

Prada, F. y col. (1989b) realizaron un extenso estudio sobre el desarrollo de las células de Müller en el embrión de pollo mediante el método de Golgi. Estudiaron embriones desde E6 hasta E20 a intervalos de medio día. Sus resultados se resumen en la figura 1.16.

E7 es el primer día en el que las células de Müller son distinguibles de las células en ciclo. Las células de Müller poseen un soma fusiforme situado a diferentes niveles de la CNI, de cuyos polos parten sendas prolongaciones que alcanzan las dos limitantes, a las que se unen con pies de conexión. La prolongación vítrea aparece bifurcada o en proceso de bifurcación. Más tarde, en E9, el soma se ubica en el tercio medio de la CNI, y toda la célula aumenta su grosor, especialmente en las capas nucleares.

La diferenciación morfológica de la célula, así como la emisión de prolongaciones,

es secuencial. Las primeras prolongaciones que se forman en la prolongación vítrea (estadio E7) están situadas en la CCG y en la CFNO. A nivel de la CPI surgen numerosas espículas. A partir de E12 y E13 salen, desde el polo vitreo del soma y hacia la MLI, numerosas prolongaciones que formarán el haz ("cabellera") de prolongaciones vítreas de la célula de Müller, el cual hacia E16 ya tiene una morfología similar a la adulta. La prolongación ventricular comienza a diferenciarse hacia E8-E9. En la porción correspondiente a la CPE aparece una cierta inflexión, con engrosamiento moderado y emisión de espículas laterales. A partir de E12 ésta prolongación se ensancha a nivel de la CNI y de ella parten

pequeñas prolongaciones que se disponen entre los somas de las neuronas vecinas. La porción más externa de la célula, a nivel de la MLE, comienza en E10 a ensancharse. Posteriormente, de estos ensanchamientos parten prolongaciones verticales hacia la CPE. En E13, la aparición y el crecimiento de estas prolongaciones hace que la parte de la célula correspondiente a la CNE adquiera un aspecto rectangular. El *microvilli* del extremo ventricular de la célula alcanza su total desarrollo hacia E16 o E17. Entre E16 y E17 parten prolongaciones accesorias de los dos tercios externos de la célula de Müller en dirección vítrea.

La mayoría de las células concluyen su diferenciación morfológica alrededor de E17 o E18, estadios en los que su morfología es similar a la de las células adultas. A lo largo de todo el desarrollo las células de la retina periférica llevan un retraso en su desarrollo de entre

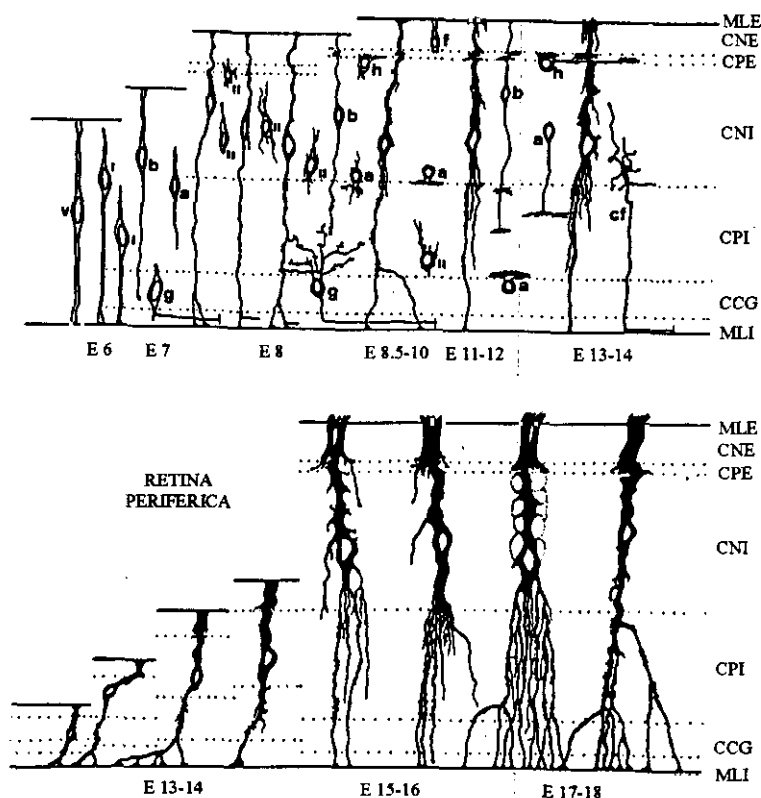


Figura 1.16 (Prada, F. y col., 1989b)

Dibujo a cámara lúcida de la morfología de la célula de Müller de la retina del pollo entre E6 y E18 en relación con la de otras células de la retina. v: célula neuroepitelial; I, b y g: neuroblastos de células ganglionares; II y a: neuroblastos de células amacrinas; b: neuroblastos de células bipolares; h: neuroblastos de células horizontales; f: neuroblasto de fotorreceptor; cf: fibra centrífuga.

2 y 4 días con respecto a la retina central, debido a que abandonan el ciclo celular de 2 a 4 días después que las células de ésta.

En nuestro trabajo de tesina de licenciatura estudiamos el desarrollo de estas células entre E7 y E11 mediante el método de Golgi, y a partir de E12, mediante un método de disgregación celular desarrollado en nuestro laboratorio (Prada, C. y col., 1991; Prada, F. y col., 1995), con el cual se consiguen células de Müller, en desarrollo y adultas, bien preservadas morfológica y estructuralmente. La disgregación celular, como ya hemos visto, ha sido utilizada por Reichenbach y Reichelt (1986) para estudiar el desarrollo postnatal de las células de Müller en retina de conejo. A pesar de que las células de Müller del pollo son bastante más complejas morfológicamente que las de conejo, con nuestro método se obtienen células disociadas con un alto grado de integridad.

Nuestros resultados obtenidos por observación de preparaciones de Golgi (figura 1.17) coinciden básicamente con los de Prada, F. y col. (1989b). Como ellos, hemos encontrado que la morfogénesis de las células es secuencial y por capas, de modo que se puede hablar de la morfogénesis de cada tramo de la célula al atravesar las distintas capas de la retina. Nuestro trabajo se focalizó hacia el estudio del mecanismo de formación de prolongaciones, en la prolongación vítrea y en la ventricular. Las primeras prolongaciones de la célula se forman a partir de la prolongación vítrea desde E7, a nivel de la CCG y CFNO. En los estadios más jóvenes se encuentran células con formas muy parecidas a las que presentan las neuroepiteliales, conectadas a ambas limitantes de la retina y con la prolongación vítrea ya bifurcada, con ambas ramas alcanzando la MLI (véase la célula A, en la figura 1.17). En el lugar donde se origina la bifurcación es frecuente encontrar una zona triangular aplanada (figura 1.17, estrella). En algunas células, una de las ramas de la bifurcación que parte de la zona triangular, no llega a la MLI y termina a veces en un pequeño abultamiento en forma de cono de crecimiento. En E9-E11 es muy frecuente encontrar en la CCG engrosamientos irregulares, a veces bastante grandes, en los que se originan abundantes prolongaciones (figura 1.17, flecha curva), en algunos casos terminadas también en estructuras abultadas, aunque muchas de las prolongaciones que crecen hacia la MLI terminan de manera filiforme, sin engrosamiento alguno. Por lo tanto, nuestros resultados indican que al menos las primeras prolongaciones vítreas que se forman crecen por conos de crecimiento, en contraposición a la idea de Cajal de que la formación de prolongaciones vítreas ocurriría por fisuración de la primitiva prolongación.

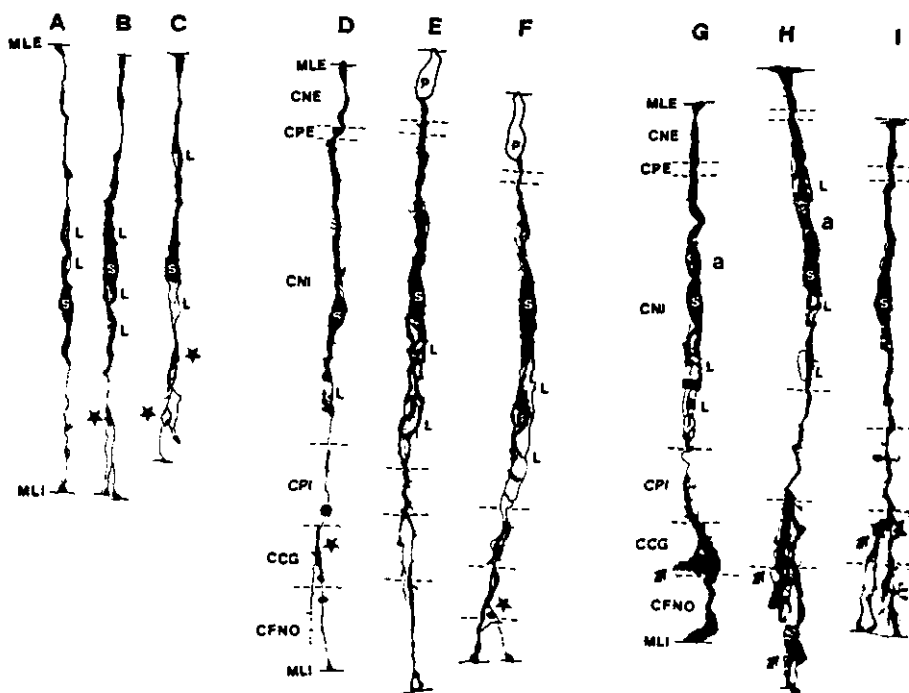


Figura 1.17 (Resultados de nuestra tesina de licenciatura aún, no publicados).

Dibujos a cámara lúcida de glioblastos de Müller teñidos por el método de Golgi en E7 (A, B y C), E9 (D, E y F) y E11 (G, H e I). s: soma celular; L: laminaciones; a: anillos; estrella: puntos de bifurcación triangulares; flecha curva: engrosamientos de la prolongación vítrea; P: precursor de fotorreceptor superpuesto a la célula de Müller.

Encontramos que la porción de la prolongación vítrea que está dentro de la CNI muestra zonas, que en algunas células son extensas, con una apariencia laminar; es decir, zonas más anchas que el resto de la prolongación, con una tinción más débil y frecuentemente recorridas por uno o varios "radios" de tinción más intensa, como la que muestra el resto de la célula (figura 1.17, L). En la porción de la prolongación ventricular que atraviesa la CNI, encontramos "anillos", zonas débilmente teñidas rodeadas, totalmente o en su mayor parte, por zonas de tinción intensa (figura 1.17, a). Las zonas laminares ya se observan en E7. Van aumentando su extensión hasta E10 y disminuyen en número y extensión a partir de E11.

Uno de los criterios establecidos para identificar los glioblastos de Müller es que las células han de estar conectadas a las dos limitantes de la retina. Sin embargo, nosotros hemos descubierto que desde los primeros estadios (E7) hay células que están conectadas a la limitante ventricular y no a la vítrea, pero que tienen el aspecto típico de los glioblastos de Müller que hemos descrito anteriormente (figura 1.18). Su terminación vítrea llega sólo hasta la CCG o hasta la CFNO, pero no hasta la MLI. Estas células llegarán más tarde a la MLI,

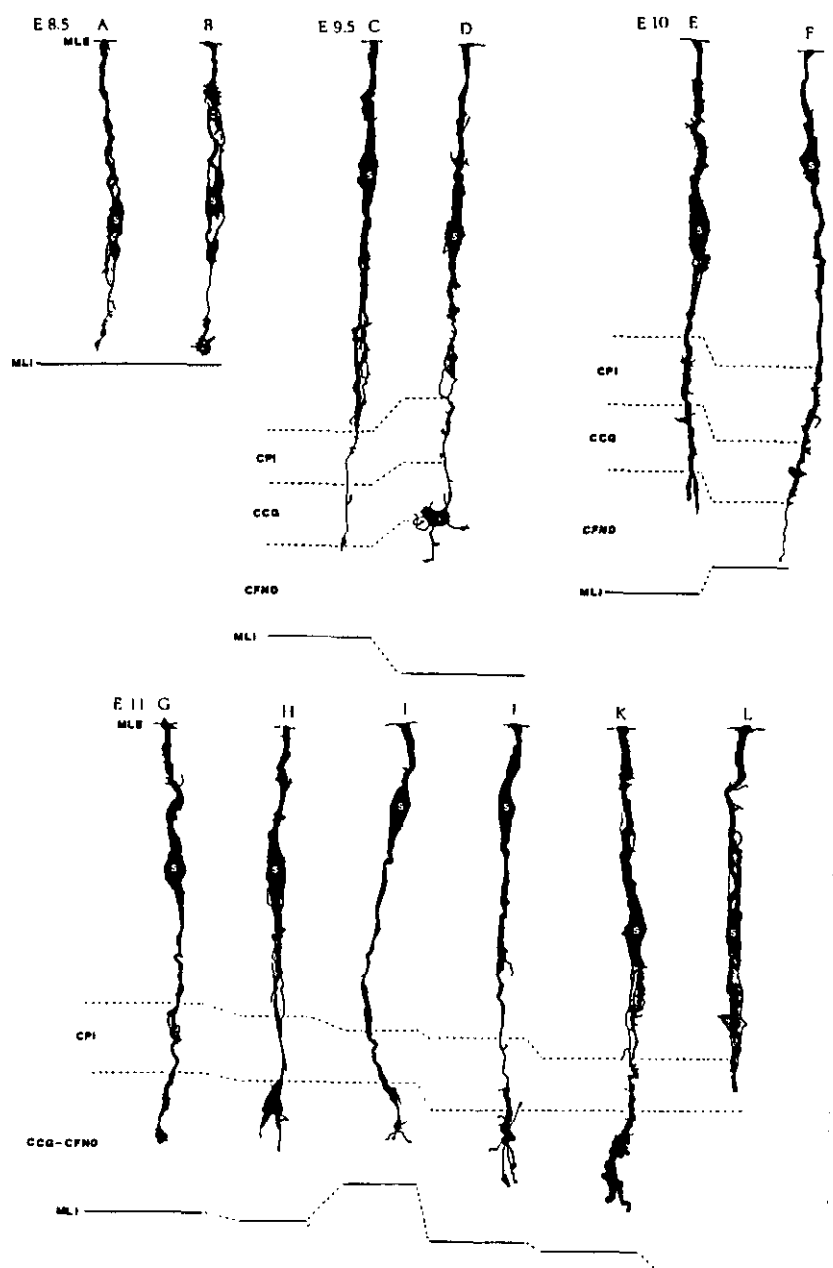


Figura 1.18 (Resultados de nuestra tesina de licenciatura, aún no publicados)

Presuntos glioblastos de Müller teñidos por el método de Golgi, cuya prolongación vítrea no alcanza la MLI. s: soma celular

puesto que en general su prolongación vítrea termina en formas variadas, muchas de las cuales recuerdan a las de los conos de crecimiento axónicos.

La explicación que ofrecemos para la existencia de estas dos clases de glioblastos, los conectados a ambas limitantes o sólo a la ventricular, es que, hasta E6 en retina central, las células en fase G_1 del ciclo celular están conectadas a las dos limitantes de la retina (Prada,

C. y col., 1981, Prada, C. y Ramírez, 1983), por lo que los glioblastos que abandonan el ciclo antes de este estadio (Prada, C. y col., 1991) conservan ambas conexiones; sin embargo, a partir de E6, las células en fase G₁ del ciclo celular no llegan a contactar con la limitante vítrea (Prada, C. y Ramírez, 1983), en consonancia con el desplazamiento de la zona de síntesis del DNA hacia el medio del neuroepitelio (Fujita, 1963; Prada, C. y Ramírez, 1983), por lo que los glioblastos generados a partir de E6, al menos inicialmente, no contactan con esta limitante vítrea.

A partir de E12 realizamos un estudio preliminar en células disociadas de toda la retina. En este estadio la prolongación vítrea es más larga y delgada que la ventricular. En su porción más próxima al vítreo se aprecian unos engrosamientos irregulares de los que salen finas prolongaciones. En E14 se observa que los engrosamientos van disminuyendo en número y en tamaño y que la ramificación es más notoria; además, observamos que en este estadio comienzan a surgir de la parte de la prolongación vítrea más cercana al soma prolongaciones pequeñas y finas. Durante los siguientes estadios encontramos que estas prolongaciones crecen y se ramifican hasta formar una gran "cabellera". De modo que hemos observado un crecimiento gradual de las prolongaciones vítreas, que ocurre, aproximadamente entre E14 y E18. A partir de E18-E19, y ya en el estado adulto, no se distingue la gruesa prolongación original a partir de la que surge la "cabellera".

Entre E13 y E15 aumenta de tamaño la parte más externa de la prolongación ventricular, es decir, la porción que corresponde a la CNE. Toda esta zona se ve recubierta de abundante "sprouting" (abundantes prolongaciones cortas y transitorias). En E12 y E13 el pie de conexión de la prolongación ventricular es una zona más aplanada, de perfil irregular, de la cual parten un gran número de pequeñas y delgadas prolongaciones a modo de filopodios en varias direcciones. A partir de E14 el extremo más externo de la prolongación en algunas células tiene forma de "T" y está recubierto de abundante "sprouting". En días sucesivos, los brazos de esta "T" parecen curvarse y disponerse longitudinalmente al eje de la célula, de modo que la porción ventricular aparece ramificada. Hacia E20 esta zona alcanza su forma definitiva. En este estadio y en estado adulto hemos encontrado células que tienen la prolongación ventricular sin bifurcar, otras con la prolongación ventricular bifurcada, y otras con la prolongación ventricular dividida en un número variable de ramas, hasta cinco.

Prada, F. y col. (1989b) señalan que la morfología de la célula en E17-18 es ya muy

similar a la del adulto, e indican incluso que la cabellera vítrea es muy parecida a la del adulto hacia E16. En nuestras preparaciones hemos observado que en E20 aún hay células inmaduras en proceso de formación de prolongaciones de la cabellera y de la zona que atraviesa la CNE. Esta discrepancia en las fechas puede explicarse por diferencias en la metodología usada, puesto que estos autores han estudiado principalmente la zona más central de la retina en secciones, mientras que en nuestros disgregados estudiamos células de retina central y de periférica. En pollos recién eclosionados las células de Müller están ya totalmente diferenciadas morfológicamente, y no difieren de las de animales de días posteriores (hemos estudiado animales de hasta 1 mes de vida). Esto parece lógico, pues el pollo es un ave nidífuga y necesita desde su nacimiento una retina bien desarrollada y funcional. Así pues, en este trabajo de tesis consideraremos animales adultos a partir de la eclosión.

2. OBJETIVOS

La célula de Müller experimenta durante su diferenciación una transformación morfológica espectacular, proceso éste de cuyas bases moleculares no se sabe prácticamente nada. El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es responder a dos preguntas básicas sobre este proceso:

1-¿Cual es el mecanismo por el que la célula de Müller, que posee forma bipolar sencilla inmediatamente después de abandonar el ciclo celular, diferencia una forma tan compleja como es la de la célula adulta?

2-¿Qué moléculas participan en esa transformación?

Para responder a estas preguntas nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1-Obtener las condiciones idóneas para disgregar un número adecuado de células de Müller bien preservadas estructuralmente, suficiente para realizar estudios morfológicos e inmunocitoquímicos.

2-Estudiar comparativamente las formas de las células de Müller observadas en preparaciones de Golgi y las obtenidas por disgregación, al objeto de testar la fiabilidad del método de disgregación puesto a punto para obtener células de Müller bien preservadas estructuralmente.

3-Cuantificar el espectacular aumento de superficie de membrana que experimenta la célula de Müller durante su diferenciación.

4-Desarrollar un método de inmunocitoquímica que permitiese mapear la distribución de moléculas en células disgregadas y fijadas, bien preservadas estructuralmente. El preservar después de la disgregación la forma que las células de Müller tienen *in situ* resulta imprescindible para estudiar los cambios moleculares de su citoesqueleto durante la diferenciación.

5-Estudiar la distribución intracelular de determinadas moléculas de citoesqueleto que pudieran estar implicadas en la morfogénesis. Las moléculas elegidas son α -tubulina, β -actina y la proteína 3CB2, asociada a filamentos intermedios (Prada, F. y col., 1995). Caracterizar molecularmente las porciones de la célula identificadas como supuestos conos de crecimiento.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Instrumentos

-Incubadora, con control automático de temperatura y volteo, fabricada por Masallés, SA.

-Fotomicroscopio Zeiss modelo Universal equipado con óptica de campo claro y contraste de fases, equipo de epifluorescencia y cámara fotográfica.

-Fotomicroscopio Zeiss Axiophot, equipado con una videocámara conectada a un ordenador.

-Centrífuga Kubota 1100 con rotor RS-4/6 y adaptadores para tubos de 15 y 50ml.

3.1.2 Material biológico

Hemos utilizado embriones de pollo de la raza White Leghorn (*Gallus domesticus*), estirpe Shaver. Los huevos fecundados se obtuvieron de diferentes granjas especializadas. Se registraba el día en que se ponían a incubar, siendo éste el día cero de desarrollo. Así, sabíamos siempre el estadio (en días de incubación) en el que se encontraba el embrión. Además, en el momento de la extracción, los embriones fueron estadiados utilizando las tablas de Hamburger y Hamilton (1951). Aquéllos cuyo estadio de desarrollo no coincidía con el día de incubación, eran desechados. Algunos embriones se incubaron hasta eclosionar, y los pollos recién nacidos se mantuvieron en el animalario de nuestra Facultad de Medicina hasta alcanzar la edad deseada.

3.1.3 Productos químicos

En nuestro trabajo empleamos una proteasa extraída de *Streptomyces*, no comercializada, amablemente facilitada por el Departamento de Investigación de Fermentaciones y Síntesis Española S.A., a la que nos referiremos como proteasa SF. Se trata de una preparación cruda con un amplio espectro de actividad proteolítica. Es parcialmente inhibida por inhibidores de la tripsina, y fuertemente inhibida por bajas concentraciones de diisopropilfluorofosfato, un inhibidor específico de serín proteasas. Técnicamente es descrita como un complejo de serín-proteasas y queratinasas, y probablemente sea similar a la descrita por Sinha y col. (1991), preparada de la misma cepa de *Streptomyces*. La preparación no contiene lipasas, nucleasas, amilasas, ni glicosidasas. Los resultados expuestos en este trabajo

fueron obtenidos con una muestra del lote 12287, con una actividad específica aproximada de 24,000 unidades Anson modificadas por miligramo.

Hemos empleado 3 anticuerpos monoclonales: 3CB2, anti- β -Actina y anti- α -tubulina. El monoclonal 3CB2 nos fue proporcionado por el Dr. Enrique de la Rosa, Colaborador Científico del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. Este anticuerpo es un monoclonal (IgG) de ratón sobre el que ya hemos comentado algunos aspectos en la introducción (apartado 1.3.3.3). El patrón de expresión del antígeno que reconoce en SNC y en retina de pollo ha sido estudiado en secciones por Prada, F. y col. (1995). El monoclonal Anti- β -actina se adquirió de la casa Sigma (clon n° AC-15; número de catálogo, A5441). Es un anticuerpo desarrollado en ratón que marca específicamente la isoforma β de la actina en una gran variedad de tejidos y especies, entre ellas en pollo. Para marcar tubulina usamos el anticuerpo monoclonal MAS 077, de Sera-lab (clon YL1/2). Es un anticuerpo producido en rata y marca específicamente la forma tirosinada de la subunidad α de la tubulina de pollo y otras especies.

Como anticuerpo secundario para 3CB2 y anti- β -actina usamos un antisuero anti-ratón purificado de cabra, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) suministrado por Jackson (115-095-044), y para el anti- α -tubulina, un antisuero anti-rata purificado de cabra, conjugado con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) suministrado por Southern Biotechnology Associates (3050-03).

El suero de pollo lo obtuvimos mediante extracción intracardiaca de sangre de pollos adultos profundamente anestesiados con éter. La sangre se dejaba en reposo hasta la formación y retracción del coágulo, tras lo cual el suero se recogía, alicuotaba y conservaba a -20°C .

El resto de los productos utilizados se obtuvieron de empresas especializadas, como Merck, Sigma, etc. Las características relevantes de algunos de ellos se describirán en las secciones correspondientes.

3.2 METODOS

3.2.1 Método de disociación celular de retina de pollo

Este método se desarrolló en base al desarrollado por Prada, C. y col. (1991). Consiste básicamente en una disgregación mixta: enzimática y mecánica.

Las retinas se extrajeron del globo ocular y se trocearon finamente, con tijeras, en 200 μ l de sacarosa al 6%. Inmediatamente antes de comenzar cada disociación, se preparaba una solución stock de proteasa en sacarosa al 6% (p/v), con una concentración de 0.4 mg proteasa/ml. La retina, bien troceada, se incubaba en una solución de sacarosa al 6% que contenía entre 0.035 y 0.1 mg/ml de proteasa, tomados de alícuotas de la solución stock. La concentración de proteasa utilizada varió según el estadio de desarrollo del embrión. El volumen del medio de disociación variaba de 300 a 800 μ l por retina, también según el estadio de desarrollo. La disociación enzimática se realizó a 34°C y fue complementada con disociación mecánica. Esta consistió en pipetear 10 veces, muy suavemente, el medio de incubación, al comienzo de la disociación y cada 10 minutos. El proceso era seguido visualmente por observación de pequeñas alícuotas en un fotomicroscopio Zeiss equipado con contraste de fases. La disociación era detenida entre los 30 y los 60 minutos, cuando obteníamos una concentración idónea de las células que nos interesaban bien preservadas morfológicamente.

En los días más tempranos de desarrollo (E6-E10), la disociación se realizó en sacarosa al 10.26%, por encontrar que se obtenían mejores resultados.

La suspensión celular obtenida podía utilizarse para estudiar la morfología de las células directamente, por contraste de fases, o bien podía extenderse en cubres o portas y fijarse. Para el estudio de la forma de las células *in vivo* se disponían alícuotas de la suspensión celular sobre portaobjetos y se cubrían con cubreobjetos. La suspensión también se extendió sobre portas o cubres gelatinados, para ser posteriormente fijada. Utilizamos fijadores diferentes en función del uso posterior que hiciésemos de las preparaciones. Para observar la morfología a lo largo del desarrollo, empleamos etanol, formol y ácido acético (EFA) en proporción 18:1:1, durante 45 min. Con este fijador, las preparaciones pueden ser montadas con agua y estudiadas más tarde. Las células destinadas a ser procesadas para inmunohistoquímica, se sometieron a protocolos diferentes (que especificaremos en el siguiente apartado), al objeto de obtener el método más apropiado para preservar las formas

celulares y preservar los antígenos.

3.2.2 Inmunocitoquímica

Suspensiones celulares, obtenidas de disociaciones óptimas, fueron extendidas en cubreobjetos gelatinados de 20x20mm. El volumen de suspensión a extender debe ser pequeño (15-20 μ l), a fin de conseguir una extensión uniforme y que seque rápidamente. Los cubreobjetos con la suspensión celular se colocaron en un dispositivo construido para este fin (figura 3.1) y se centrifugaron a 2000 rpm (733g) durante 2 min, para adherir fuertemente las células. Las células destinadas a ser marcadas con 3CB2 fueron fijadas durante 15 min a 4°C con paraformaldehído (PFA) al 4% en PB a pH 7.2; las células que iban a ser marcadas con anti- α -tubulina o anti- β -actina fueron fijados según lo descrito por Fan y col. (1993). El fijador contiene PFA 3%, Glutaraldehído 0.2%, Triton X-100 0.065% y EGTA 20mM en PBS a pH 7.3. La fijación se realizó a 37°C durante 10 min. La elección de los fijadores requirió múltiples experimentos hasta encontrar el idóneo para cada anticuerpo (ver en resultados el apartado 4.4.1).

Realizamos marcajes por inmunofluorescencia indirecta, simple para cada uno de los tres anticuerpos, y doble para la colocación de anti- α -tubulina y anti- β -actina. No pudimos combinar 3CB2 con anti- α -tubulina ni con anti- β -actina, por no disponer de un fijador adecuado. En ambos casos utilizamos los protocolos corrientes para inmunohistoquímica. Para los marcajes simples, tras la fijación, los cubres con la suspensión celular fueron lavados 3 veces durante 5 minutos en una solución de Triton X-100 al 0.3% en PBS a pH 7.2, e incubados durante 30 minutos en suero de pollo al 10% en PBS con Triton X-100 al 0.3%. A continuación se incubaron durante 60 minutos con el primer anticuerpo a la dilución

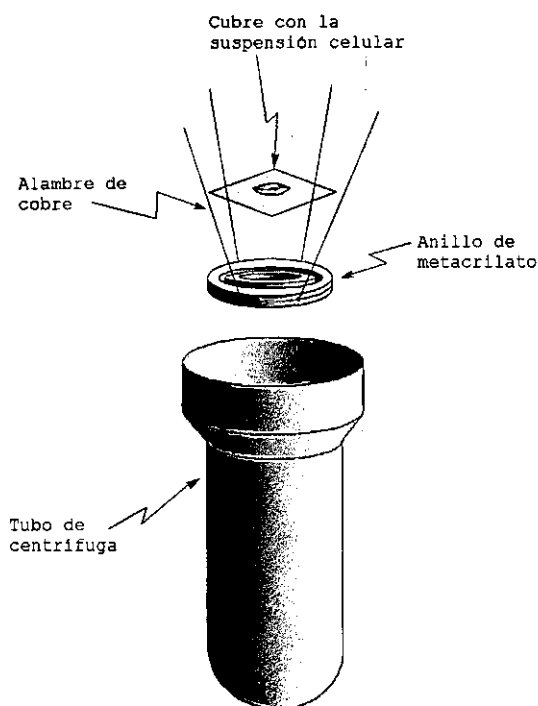


Figura 3.1

Esquema del dispositivo empleado para centrifugar los cubres. Los dos juegos de anillos están pegados entre sí y al alambre.

adecuada (3CB2: 1:200; anti- α -tubulina: 1:20; anti- β -actina: 1:500) en PBS con Triton X-100 al 0.3% y suero de pollo al 1%, se lavaron tres veces durante 5 minutos en la solución de lavado y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario durante 60 minutos (empleados a las diluciones recomendadas por los fabricantes). Los cubres se lavaron 2 veces durante 5 minutos en PBS con Triton X-100 al 0.3% y por último una vez en PBS. Finalmente, se montaron en glicerol al 70% en tampón glicina 0.5M a pH 8.6.

Para los dobles marcajes se realizaron dos inmunotinciones simples consecutivas. Después de los pasos de permeabilización y bloqueo, las células se incubaron con el anti- α -tubulina y, tras lavar, con su correspondiente secundario. A continuación se lavaron de nuevo y se incubaron con el anti- β -actina y su correspondiente secundario y se lavaron y montaron como en el caso de la inmunotinción simple.

Tanto en el caso de marcajes simples como en el de los dobles se procesaron los correspondientes controles. En ellos se sustituyeron los anticuerpos primarios o los secundarios por la solución empleada para bloquear las uniones inespecíficas.

3.2.3 Documentación de los resultados

Las microfotografías que presentamos han sido obtenidas con un fotomicroscopio Zeiss Universal, utilizando óptica de contraste de fases para las células sin teñir y epifluorescencia para las preparaciones de inmunocitoquímica. Los objetivos más corrientemente utilizados fueron de 25x (nA, 0.65), 40x (na, 1.0) y 100x (na, 1.3). Las fotografías de células de disociaciones frescas, sin teñir, fueron tomadas con película Kodak Tmax de 400 ASA de sensibilidad. Esta película de alta sensibilidad es necesaria para minimizar el tiempo de exposición, ya que las células se pueden mover en el medio de disociación. Es también por este motivo por lo que a menudo fotografiamos células que estaban unidas a grupos de células que no habían sido totalmente disociadas, ya que estos grupos, más voluminosos, tienen menor movilidad. Dado que estas células son bastante largas y complejas, a menudo es preciso fotografiarlas varias veces en distintos planos de enfoque, y posteriormente montar las fotografías obtenidas. Las células disociadas y fijadas con EFA han sido fotografiadas con película Ilford de 50 ASA de sensibilidad.

Las fotografías de células disociadas marcadas por inmunofluorescencia se obtuvieron iluminando intensamente las preparaciones, mediante una lámpara de mercurio de muy alta presión (Osram HBO), con luz de la longitud de onda adecuada a los fluorocromos

empleados, mediante un equipo de epifluorescencia Zeiss (Para fluorescencia con FITC: filtro de excitación BP 450-490, divisor cromático FT 510, filtro de supresión LP 520; para fluorescencia con TRITC: filtro de excitación BP 546/12, divisor cromático FT 580, filtro de supresión LP 590). La película empleada fue Kodak Tmax de 400 ASA de sensibilidad. Los tiempos de exposición se dieron manualmente, y se determinaron haciendo pruebas de exposición hasta encontrar los tiempos óptimos. Buscamos los tiempos en los que la relación señal-fondo fuera más favorable, siempre buscando el máximo detalle de la señal. Cuando se empleaba el objetivo de 40x cada célula se fotografiaba 2 ó 3 veces con tiempos de exposición diferentes para obtener la fotografía de mejor calidad. No se apreció una pérdida significativa de fluorescencia con los tiempos de exposición empleados (4-10 s para FITC, 8-20 s para TRITC). Las células fotografiadas con objetivo de 100 aumentos sí experimentaron una fuerte disminución de la fluorescencia emitida, pues por una parte la luz de excitación es mucho más intensa, al condensarse más con este objetivo, y por otra las exposiciones son más largas (30-60 s). algunas de las células fueron primero fotografiadas con el objetivo de 40x, para mostrar el aspecto general, y posteriormente, con el objetivo de 100x, para ampliar detalles concretos. Las células con doble marcaje de β -actina y α -tubulina se fotografiaron sucesivamente con los juegos de filtros adecuados para cada marcaje. Fotografías con cada uno de los dos marcajes se dibujaron cuidadosamente en papel transparente y se superpusieron, para obtener una visión conjunta de la distribución de ambos marcajes. El revelado y positivado de los negativos ha sido realizado en nuestro laboratorio.

4. RESULTADOS

4.1 DISGREGACION DE LA CELULA DE MÜLLER CONSERVANDO SU INTEGRIDAD ESTRUCTURAL

Hemos realizado un total de 177 disociaciones de retinas de embriones de todos los estadios de desarrollo a partir de E6, y de animales adultos. Partiendo de resultados preliminares obtenidos en nuestro trabajo de tesina, ajustamos las condiciones para conseguir digregaciones con un elevado número de células de Müller y con un alto grado de preservación morfológica, es decir, con las formas que tienen *in situ* a lo largo del desarrollo. Los criterios para definir una célula como bien preservada fueron: 1) la ausencia de vacuolización, 2) la presencia de un núcleo nítido y refringente y 3) el poseer en cada estadio la forma correspondiente a la observada en preparaciones de Golgi. Las células bien preservadas, así como aquéllas que aun careciendo de muchas de sus prolongaciones son identificables como células de Müller, excluyen el azul de tripano, lo que demuestra que son células vivas. De hecho, la mayoría de las células presentes en nuestras disociaciones excluyen este colorante, que sólo es tomado por una pequeña proporción de células con evidentes signos de deterioro. En las figuras 4.2, 4.3 y 4.4 mostramos numerosos ejemplos de células de Müller disgregadas, tanto vivas, en su medio de disociación, como fijadas, con su morfología bien preservada y similar a la que se puede observar en preparaciones de Golgi.

Los parámetros que se han revelado más importantes para la obtención de una buena disociación son: la temperatura de incubación, la concentración de proteasa, el volumen de medio de incubación y la concentración de sacarosa en éste. La temperatura de incubación idónea resultó ser de 34°C. El resto de parámetros varían en relación al estadio. El tiempo empleado en la disociación osciló entre 30 y 60 minutos. Cuanto mayor es el tiempo de disociación, mayor es el número de células disociadas, pero también es mayor la proporción de éstas que se deterioran, por lo que es necesario detener la disociación cuando se aprecia que hay una cantidad conveniente de células, aunque no se alcance la disociación completa del tejido. En la tabla 4.1 presentamos los valores óptimos de los parámetros que determinan el resultado de la disociación para cada estadio. Con los valores que indicamos en la tabla se consiguen disociaciones óptimas de células de Müller a los estadios indicados, entendiéndose por disociación óptima aquélla en la que se obtiene el máximo número de células morfológicamente bien preservadas.

Tabla 4.1

Condiciones óptimas de disociación para células de Müller de la retina de pollo embrionaria y adulta.

ESTADIO DE DESARROLLO	VOLUMEN DEL MEDIO DE INCUBACION (μ l)	NUMERO DE RETINAS / EXPERIMENTO	CONCENTRACION DE SACAROSA (% P/V)	CONCENTRACION DE PROTEASA (mg/ml)
E6	600	2	10.26	0.035
E7	600	2	10.26	0.042
E8 y E9	600	2	10.26	0.055
E10	600	1	10.26	0.055
E11	600	1	6	0.055
E12-E17	600	1	6	0.07
E18	600	1	6	0.083
E19	800	1	6	0.084
E20	800	1	6	0.094
ADULTO	800	1	6	0.1

El resultado de la disociación depende también en buena medida de la meticulosidad en el seguimiento del protocolo experimental. Así, pequeños incrementos o decrementos en la concentración de proteasa aceleran o retrasan el proceso, obteniéndose mayor número de células deterioradas en ambos casos. Variaciones del volumen del medio de incubación y/o de la cantidad de tejido determinan variaciones en la densidad de células del disgregado final. Si el volumen de medio de incubación empleado supera los valores de la tabla para la misma masa de tejido, el resultado de la disociación se ve afectado negativamente, de modo que las células se deterioran más rápidamente a medida que se van disgregando. Así pues, hemos encontrado que hay una relación idónea entre la cantidad de tejido y el volumen del medio, con la que se consiguen buenas disgregaciones. Por ésto, en los estadios más jóvenes empleamos dos retinas en 600 μ l de medio, mientras que en estadios más avanzados usamos una retina en 600 μ l y, en los últimos estadios y en adulto, una retina en 800 μ l. También hemos encontrado muy importante el proceso de troceamiento fino del tejido, previo a la disociación, así como la ayuda mecánica realizada de un modo muy suave.

La concentración de sacarosa que utilizamos en la mayoría de los estadios es del 6%.

Esta concentración de sacarosa proporciona al medio de disociación una osmolalidad de 175 mOsm/Kg. La concentración de sacarosa que proporciona una osmolalidad fisiológica (300 mOsm/Kg) es del 10.26%. Sería esperable, pues, que con esta concentración de sacarosa las células quedaran mejor preservadas. Sin embargo, en nuestra experiencia ésto sólo ocurre en los primeros estadios de desarrollo. En el resto de estadios se obtienen mejores resultados empleando sacarosa al 6%.

Los resultados que mostramos en la tabla resultan insólitos en el campo de la disgregación de tejidos por tres motivos. Primero, la relación entre el volumen del medio de incubación y la masa de tejido (nº de retinas/experimento) varía con el estadio de desarrollo, mientras que en los procedimientos de disociación corrientemente usados estos parámetros tienen valores constantes, independientemente del tipo de tejido o del estadio de desarrollo. Segundo, la osmolalidad del medio de incubación requerida a partir de E11 para obtener células de Müller estructuralmente bien preservadas es inferior a la del plasma (300mOsm/Kg), ya que a partir de este estadio da mejores resultados (más células y mejor preservadas) incubar en sacarosa al 6% (175mOsm/Kg) que en sacarosa al 10.26% (300mOsm/Kg). Sin embargo, cualquiera de los métodos corrientes de disociación utilizan medios de incubación de osmolalidad fisiológica, la cual es ajustada con una mezcla de sales a concentraciones fisiológicas. Tercero, la concentración de proteasa incrementa con el estadio de desarrollo de 0.035 mg/ml a 0.1mg/ml. Los otros métodos utilizan concentraciones de proteasa constantes (en torno a 1mg/ml), independientemente del tipo de proteasa, tejido o estadio de desarrollo. La proteasa SF es, por tanto, mucho más activa que cualquiera de las comercialmente disponibles, pues funciona a concentraciones entre 10 y 100 veces menores que éstas.

Aunque nuestro objetivo era obtener las condiciones idóneas para disociar las células de Müller, en los disgregados no sólo encontramos estas células, sino que también encontramos todos los tipos de células de la retina (figura 4.1). Cuando al extraer la retina quedan adheridas porciones de epitelio pigmentario, las células de este epitelio también se disgregan y se observan en el medio (figura 4.1, F). Hemos encontrado que el tipo de células que se observan durante el proceso de disgregación es función del tiempo. Así, durante los primeros 10 min sólo se observan algunas células aisladas, posiblemente resultado del proceso mecánico, y abundantes restos celulares, resultado sin duda del troceamiento inicial del tejido. A los 20 minutos, aproximadamente, las células más abundantes son fotorreceptores y

ganglionares (figura 4.1, A y E), células éstas situadas en ambas superficies de la retina, acompañadas de algunas células bipolares y amacrinas (figura 4.1, C y D). Hacia los treinta minutos, aproximadamente, hay gran cantidad de fotorreceptores, células ganglionares, amacrinas y bipolares, y comienzan a aparecer algunas células horizontales (figura 4.1, b) y células de Müller, estas últimas frecuentemente unidas a grupos de fotorreceptores. Hacia los cuarenta y cinco minutos ya aparece una buena proporción de células de Müller, además de todos los otros tipos celulares. Si el tiempo es superior a 45 min, hasta 1.5 h, las células de Müller llegan a ser mayoría, junto con las células bipolares. Esta secuencia de disociación de

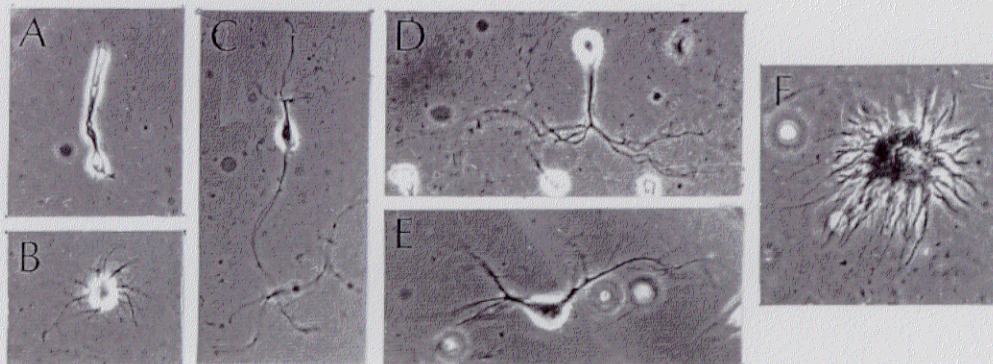


Figura 4.1

Ejemplos de varios tipos de células de retina disociadas. Todas ellas pertenecen a animales adultos excepto E, disociada de un embrión en E16. A: bastón; B: célula horizontal, con el comienzo de su axon; C: bipolar con maza de Landolt; D: célula amacrina; E: célula ganglionar; F: célula del epitelio pigmentario. Aumentos: 400x.

tipos celulares resulta lógica, pues las células ganglionares y los fotorreceptores son las células a las que primero tiene acceso la proteasa, mientras que las Müller, que ocupan todo el grosor de la retina, aparecen cuando la mayor parte de las otras células ya han sido liberadas del tejido. Además, las células de Müller tienen uniones adherentes con los fotorreceptores y con otras Müller, por lo que es frecuente que aparezcan varias de ellas unidas entre sí y/o a grupos de fotorreceptores. Los tipos celulares observados en los disgregados también varían en relación al estadio de desarrollo. Así, mientras las células de Müller, las bipolares, los fotorreceptores y las horizontales se observan a lo largo de todo el desarrollo y en los animales adultos, no ocurre así con las células ganglionares y amacrinas. Es notable el caso de las células ganglionares, las cuales desaparecen de las disgregaciones a partir de E18 aproximadamente, no pudiéndose observar a partir de este estadio. Las células amacrinas también disminuyen en número y diversidad de tipos en animales adultos.

4.1.1 Resumen

Hemos puesto a punto un método de disociación celular, óptimo para la extracción de células de Müller de retina de pollo, basado en el método desarrollado por Prada, C. y col., (1991). Difiere de otros métodos de disociación en que se emplea una proteasa distinta (la proteasa SF), mucho más activa que las actualmente disponibles, y en que diversos parámetros que afectan al resultado de la disociación, incluyendo la osmolalidad, son modificados en función del estadio de desarrollo para conseguir células con una morfología óptimamente preservada.

Con este método de disociación hemos obtenido células de Müller con morfología similar a la que presentan *in situ* cuando son impregnadas con el método de Golgi.

4.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FORMAS CELULARES OBSERVADAS EN LOS DISGREGADOS Y EN PREPARACIONES DE GOLGI: FASES DE LA MORFOGENESIS

Para valorar la fiabilidad de nuestro método realizamos un estudio comparativo de las formas que aparecen en los disgregados y las formas que sabemos que tienen las células de Müller en las preparaciones impregnadas con el método de Golgi, tanto a lo largo del desarrollo como en el adulto. Las formas que presentan en preparaciones de Golgi las conocemos por los trabajos de otros autores (Cajal, 1892, Prada, C. y col., 1983 y Prada, F. y col., 1989b), y por nuestros propios resultados de Tesina de Licenciatura, como hemos expuesto en los apartados 1.3.2 y 1.4.3 de la Introducción.

4.2.1 Morfogénesis

En los disgregados hemos encontrado las formas descritas con el método de Golgi, desde las bipolares más sencillas en los primeros días de desarrollo, hasta las más complejas en días más avanzados, aunque hemos observado algunas diferencias en las formas obtenidas con ambos métodos. Del estudio comparativo de las formas obtenidas con uno y otro método a lo largo del desarrollo, hemos distinguido 3 fases en la morfogénesis de la célula de Müller:

1ª Fase: Emisión de múltiples prolongaciones pequeñas y transitorias (*sprouting*) en toda la superficie celular (figura 4.2 A, B).

2ª Fase: Ramificación de la prolongación vítrea en su porción distal al soma (figura 4.2 C, D). Durante esta fase las células aún presentan un *sprouting* generalizado que va disminuyendo gradualmente hasta su casi total desaparición al final de esta fase.

3ª Fase: Diferenciación final de la célula. Encontramos dos procesos básicos:

A) Emisión y crecimiento de las prolongaciones que formarán la cabellera de prolongaciones vítreas en la célula adulta, a partir de la porción de prolongación vítrea proximal al soma (figura 4.3 A-F).

B) diferenciación de la porción distal de la prologación ventricular (figura 4.3 G-K), con formación de la ramificación a nivel de la CNE.

Las células en fase 1 se observan desde E8 a E12, las células en fase 2 desde E8 a E15, y las células en fase 3 desde E14 hasta la eclosión.

Las células en fase 1 se corresponden con las formas más simples, bipolares,

observadas con el método de Golgi, aquéllas que acaban de abandonar el ciclo celular (compárense las formas de los glioblastos de Müller en la figura 1.13, en E7-7.5 y las de la figura 4.2 A, B). En los disgregados estas células aparecen abundantemente recubiertas de un *sprouting* generalizado, que no se observa en células teñidas por el método de Golgi. Las células en fase 1 se observan en los disgregados entre E8 y E12, lo cual no significa que la célula esté en esta fase durante tan largo período de tiempo. El proceso de morfogénesis de las células de Müller no es sincrónico en toda la retina (Prada, F. y col., 1989b), sino que hay un gradiente de diferenciación de retina central a periférica, con células menos diferenciadas en ésta. Nosotros disociamos la retina completa, incluyendo la mayor parte de la retina periférica. La inclusión de ésta en los disgregados explica que encontremos células muy jóvenes, en fase 1, durante esos cuatro días.

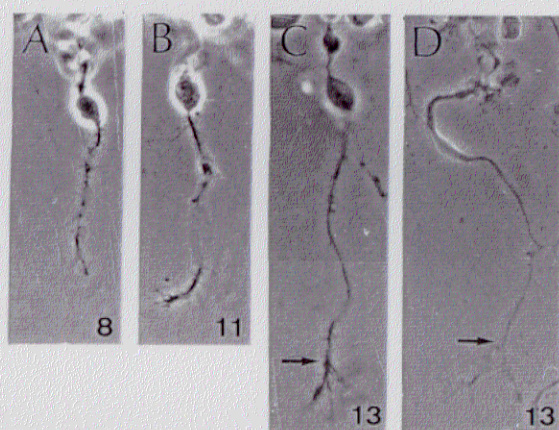


Figura 4.2

Células de Müller en las fases 1 (A y B) y 2 (C y D) de diferenciación. Los números indican el estadio de desarrollo. Las células se han dispuesto con su prolongación ventricular hacia arriba y la vítrea hacia abajo. A, B y C: fotografías de células recién disgregadas, aún vivas; D: célula fijada. Nótese el *sprouting* tan generalizado que se aprecia en la célula A y que va disminuyendo en B y C hasta desaparecer en D. En A, B y C apenas se aprecia la prolongación ventricular, por estar incluida en un grupo de células y/o estar fuera de foco. La **flecha** señala el punto de ramificación de la prolongación vítrea. Aumentos: 650x.

Las células en **fase 2** se caracterizan en las preparaciones de Golgi por la emisión de prolongaciones a nivel de la CCG y CFNO, aunque también ocurren otros fenómenos, como es la aparición de laminaciones, principalmente en la porción de célula que atraviesa la mitad vítrea de la CNI (figura 1.17 B-I). En las preparaciones de Golgi de E7 es frecuente observar las prolongaciones surgiendo a partir de pequeñas porciones de la prolongación vítrea, aplanadas y de forma triangular (figura 1.17, estrella), formadas a nivel de la CFNO. Desde E9 hasta E11 se siguen observando estas zonas triangulares en algunas células, mientras que en otras las prolongaciones parten de engrosamientos irregulares situados en la CCG y CFNO (figura 1.17, flecha curva). Si bien en los disgregados hemos encontrado toda la variedad de formas de estos estadios, no hemos encontrado las laminaciones que se observan en las preparaciones de Golgi, y las porciones triangulares de donde parten las prolongaciones del extremo vítreo han sido observadas raramente, lo cual puede ser explicado por pérdida de la

forma de las zonas laminares tras la disgregación. En E13 y E14, coincidiendo con la desaparición progresiva del *sprouting*, la ramificación de la prolongación vítrea se hace más patente, con ramas de mayor longitud y grosor (figura 4.2 C, D).

Durante la **fase 3** encontramos dos procesos morfogenéticos notables: **A)** la formación de la cabellera de prolongaciones vítreas (figura 4.3 A-F) y **B)** la diferenciación del extremo de la prolongación ventricular (figura 4.3 G-K).

Las prolongaciones de la cabellera comienzan a emitirse hacia E13, bien desde el polo vítreo del soma o desde porciones de la prolongación vítrea próximas al soma celular. En estos estadios aparece un notable *sprouting* en esa porción de la célula (figura 4.3 A, flecha). Posteriormente (E15-E16), de esa zona parten una o varias prolongaciones más largas, normalmente recubiertas de otras prolongaciones mucho más pequeñas que les dan un aspecto "barbado" o espinoso (figura 4.3, flechas en B y C). En E16-E17, el número de prolongaciones es mayor, así como su longitud (figura 4.3, flecha en D). Posteriormente, las prolongaciones más largas pierden el *sprouting*, que se conserva en las más cortas y en la zona de la prolongación principal más próxima al soma. En E18, aun cuando muchas de las nuevas prolongaciones han perdido ya el *sprouting*, y algunas de ellas ya alcanzan una longitud y grosor que hace imposible reconocer cual de las prolongaciones es la original, quedan aún prolongaciones claramente en proceso de crecimiento, pues son mucho más cortas que las restantes. En E19 vemos que aunque hay células que siguen presentando alguna prolongación corta, muchas de ellas ya son largas e indistinguibles de la prolongación original, con lo que la morfología de las células en este estadio es muy similar a la de las adultas (figura 4.3 E, F). Durante todo el periodo que estamos considerando, las prolongaciones parten de zonas de la prolongación original cercanas al soma. Desde los puntos de origen de estas prolongaciones hasta los de las prolongaciones distales que se originaban en la fase 2, queda un tramo de prolongación en el que no se emite ninguna prolongación. Esta zona libre de prolongaciones se corresponde, muy probablemente con la CPI. Las prolongaciones vítreas más diferenciadas terminan en abultamientos que se corresponden con los pies de anclaje observados en las preparaciones de Golgi, aunque a veces van rematados con prolongaciones muy finas (figura 4.3, asterisco en E), no detectadas con ese método.

El método de disgregación también nos ha proporcionado información nueva sobre el desarrollo de la prolongación ventricular; sin embargo, debido a que muchas veces la célula

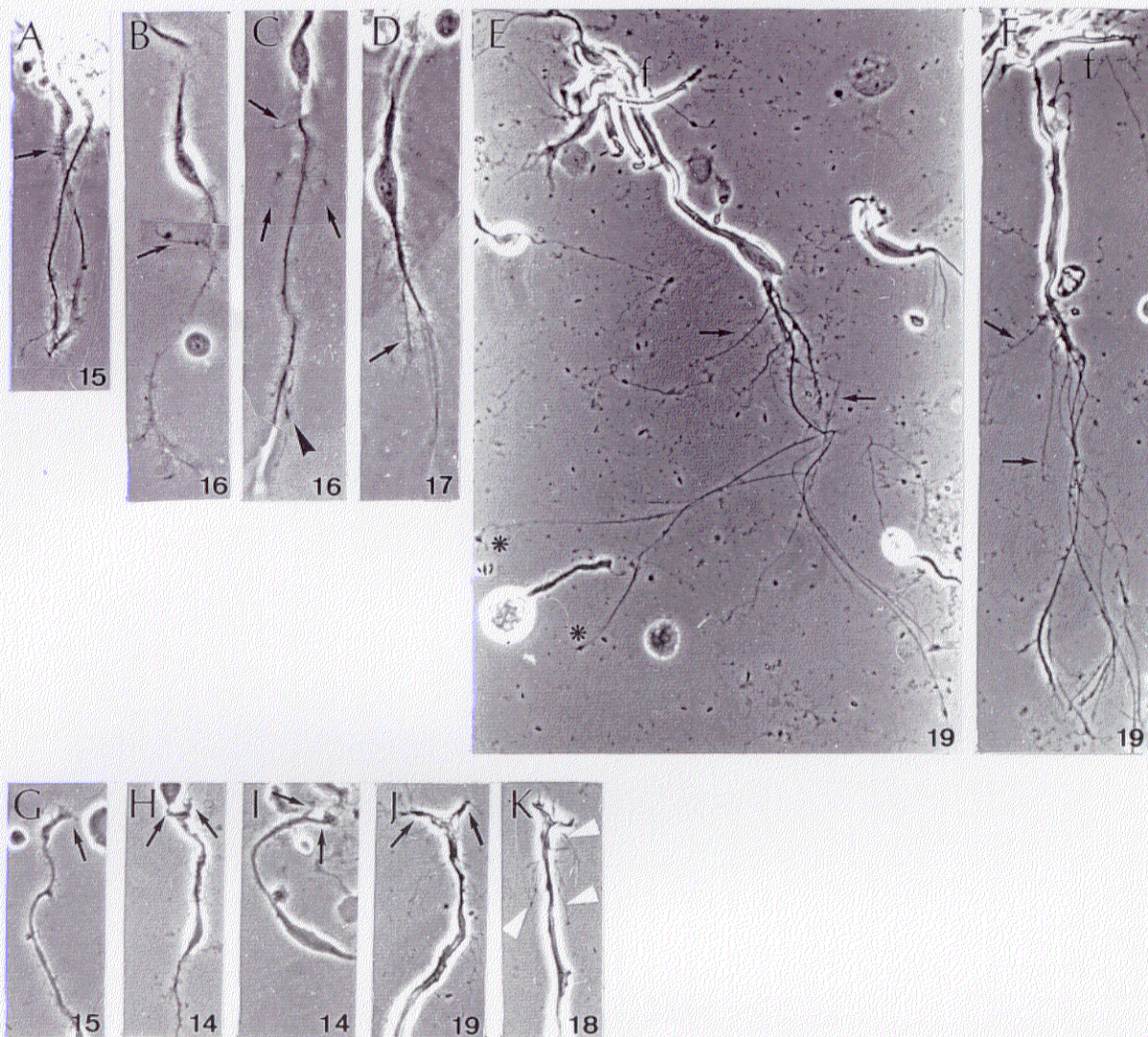


Figura 4.3

Muestra de células disociadas en fase 3 de diferenciación. Los números indican el estadio de desarrollo. En la serie superior (A-F) mostramos la formación de la cabellera vítrea mediante la emisión de prolongaciones (**flechas**) a partir de la porción de prolongación vítrea más próxima al soma. Nótese en C que en la porción distal de la prolongación vítrea aún continúa la emisión de prolongaciones durante esta fase, y que éstas van rematadas por pequeños abultamientos con formas de conos de crecimiento (**cabeza de flecha**); el **asterisco** marca engrosamientos al final de algunas de las prolongaciones de la cabellera, que posiblemente sean los pies vítreos; En la serie inferior (G-K), mostramos la diferenciación de la prolongación ventricular. Las **flechas blancas** en esta serie señalan la zona aplanada en forma de "T" en los estadios iniciales (G), y las prolongaciones en las que se divide en estadios posteriores (H-J); **cabezas de flecha blancas**: prolongaciones muy finas que se orientan hacia la CPE (ver apartado 4.2.2 para más aclaración); la célula H, de un embrión de E15, tiene la parte ventricular menos diferenciada que la célula I, de un embrión de E14, lo cual se explica por la mezcla de células con distinto grado de diferenciación que hay en una misma retina en cada estadio. Las fotografías de A a D son de células recién disociadas, mientras que las de E a K son de células fijadas. f: fotorreceptores en diferenciación que quedan unidos a las células de Müller por la MLE. Aumentos: A: 400x; resto de fotografías: 650x.

queda unida por el extremo de esta prolongación a grupos de fotorreceptores (como se muestra en la figura 4.3, f en E y F) y a otras células de Müller, es difícil obtener abundantes ilustraciones de este proceso. Prada, F. y col. (1989b) describieron que se produce un ensanchamiento a nivel de la MLE del que posteriormente parten prolongaciones hacia el límite entre la CNE y la CPE (figura I.3, HH 37-40). Tras esto, la parte de la célula que atraviesa la CNE aparece como una zona muy engrosada de perfil rectangular. En nuestros disgregados hemos visto algunos ejemplos de células en proceso de crecimiento de estas prolongaciones, pero fundamentalmente hemos observado células en diferentes estadios de ramificación de la prolongación ventricular. Este proceso se caracteriza por la aparición en la zona más distal de la prolongación de un aplanamiento que da a esta parte de la célula una forma de "T" (figura 4.3, flecha en G). Las ramas que forman la porción horizontal de esta "T" se curvan (figura 3, flechas en H) y se dirigen hacia la capa pigmentaria disponiéndose en paralelo con el eje longitudinal de la célula, convirtiéndose la "T" en una "Y" (figura 4.3, flechas en I, J). Las ramas de esta "Y" aparentan ramificarse en algunas células. En otras, sin embargo, no aparece esta ramificación de la prolongación ventricular, y terminan en la MLI en una zona engrosada (figura 4.3 K), a partir de la cual surge el *microvilli* que se observa en la célula adulta.

4.2.2 Formas adultas

El estudio de las formas de la célula de Müller adulta fue realizado para completar el estudio preliminar de Tesina (ver Introducción, apartado 1.3.2). Estábamos interesados en encontrar en los disgregados las células de tipo II (Prada, F. y col., 1989b), que no habíamos encontrado anteriormente, así como en estudiar en detalle la variabilidad morfológica que ya vislumbramos en nuestro trabajo de tesina.

En la figura 4.4 mostramos una selección de células adultas, con las que ilustramos la variedad de formas respecto a la ramificación de la prolongación ventricular y de la cabellera vítrea, que no muestra el método de Golgi.

Las células muestran gran variabilidad en el extremo distal de la prolongación ventricular, que puede ser simple (figura 4.4 A), bifurcado (figura 4.4 B, F), o presentar varias ramificaciones (figura 4.4 C-E, J). En el caso de terminaciones bifurcadas, cada rama puede a su vez dividirse (figura 4.4 B), o puede dividirse sólo una de ellas (figura 4.4 F). Todas las prolongaciones terminan en la MLE formando unos pequeños engrosamientos

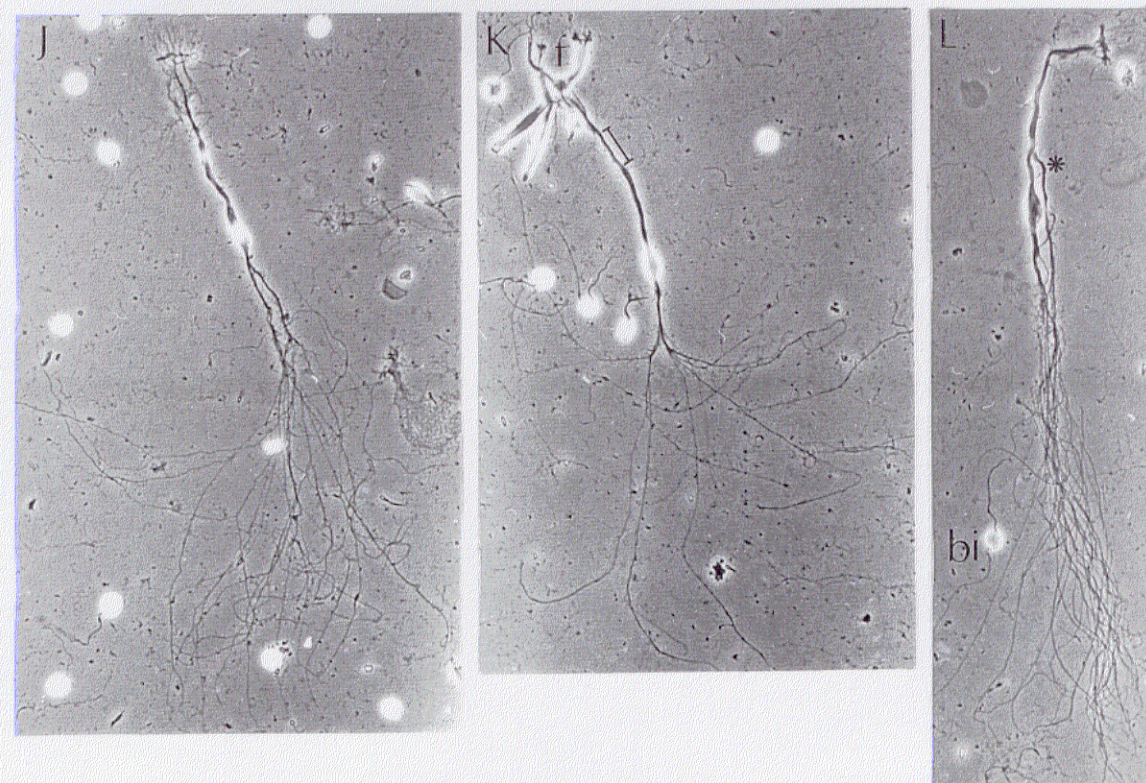
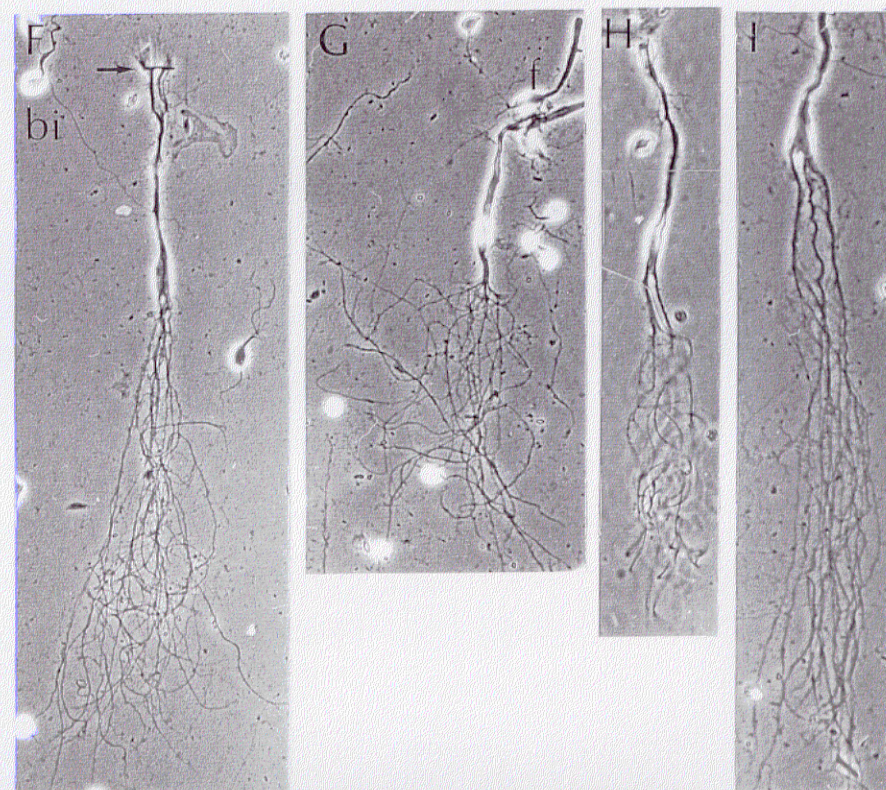
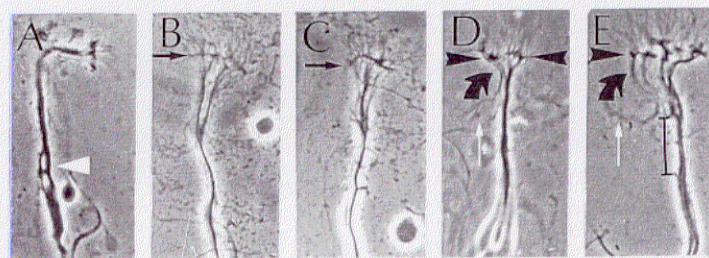


Figura 4.4

Selección representativa de las formas de las células de Müller adultas. Las fotografías A, D y H fueron tomadas de células vivas en su medio de disociación; el resto son de células fijadas. Con ellas mostramos la variabilidad de formas adultas, tanto a nivel de la prolongación ventricular (A-E), como de la prolongación vítrea (F-L). **Cabeza de flecha blanca:** anillos en la prolongación ventricular; **cabeza de flecha negra:** engrosamientos de las prolongaciones ventriculares a nivel de la MLE; la unión de estas prolongaciones forma una especie de placa en algunas células (**flecha negra**); **flecha curva:** prolongaciones surgiendo aparentemente desde la zona de la MLE; **barra:** zona ligeramente más estrecha que el resto de la prolongación ventricular y que podría corresponder a la CPE; **flecha blanca:** prolongaciones muy finas surgiendo de la ventricular o de las ramas en que ésta se divide en su extremo distal; **asterisco:** prolongación accesoria; **f:** fotorreceptores; **bi:** células bipolares. Aumentos: A, D, F, G, H, J, K y L: 400x; B, C, E e I: 650x.

(figura 4.4, cabeza de flecha en D y E, como ejemplo), que a veces son continuos con los de la prolongaciones vecinas, de modo que forman una especie de placa (figura 4.4, flecha en B, C y F, como ejemplo), de la cual salen numerosas prolongaciones muy finas (*microvilli*) hacia la capa de conos y bastones. A esta placa suelen estar íntimamente unidos algunos fotorreceptores (figura 4.4, f en G y K), cuyos somas y parte de los segmentos internos se encuentran a veces entre las prolongaciones ventriculares de las Müller. En algunas células da la impresión de que estas prolongaciones ventriculares están conectadas entre sí por laminaciones, de modo que contribuirían a rodear y, en cierto modo, aislar los somas de los fotorreceptores, al menos parcialmente. A veces se observan prolongaciones que, en vez de surgir por bifurcación de la prolongación ventricular, como hemos señalado, parecen surgir de la placa de la MLE y se orientan en dirección al vítreo (figura 4.4, flecha curva en D y E). En la región de la célula contigua a la ramificación de la prolongación ventricular, es frecuente ver una zona más estrecha que el resto de esta prolongación, aunque no resulta tan patente como señalan Prada, F. y col. (1989b) en sus preparaciones impregnadas con el método de Golgi (se señala, a modo de ejemplo, en las células en E y K de la figura 4.4, con una barra). Desde las regiones contiguas a este estrechamiento, que se corresponde por su posición con la CPE, e incluso de prolongaciones que parten de la MLE, se forman prolongaciones muy finas que *in situ* se orientan hacia la CPE (figura 4.4, flecha blanca en D, E; ver también la figura 4.3 K, cabezas de flecha). Estas prolongaciones son tan finas que en las células fijadas apenas se ven, e *in vivo* son muy difíciles de fotografiar por la dificultad de obtenerlas en un solo plano de enfoque. Esto ha impedido que estudiemos su formación en estadios embrionarios. Estas prolongaciones podrían estar relacionadas con el aislamiento de contactos sinápticos en la CPE. En la porción de prolongación ventricular que atraviesa la CNI hemos observado en algunas células laminaciones más o menos extensas y anillos (figura 4.4, cabeza de flecha blanca en A).

El soma de la célula tiene forma aproximadamente elíptica, y un grosor algo mayor que el de la prolongación ventricular. No hay gran variación de tamaño de unos somas a otros. De él parten, o bien las prolongaciones que forman la cabellera vítrea, o bien de una a tres prolongaciones relativamente cortas de las que salen las prolongaciones que forman la cabellera. Cuando del soma parte más de una prolongación, éste adopta una forma más triangular (muy patente en la figura 4.4 I). También hay variabilidad en cuanto a la distancia desde el soma al punto de origen de la cabellera vítrea. Esta, como ya hemos indicado, puede

salir directamente del soma (figura 4.4 F), aunque es la forma observada con menos frecuencia. Más frecuentemente hemos observado que la cabellera sale a una distancia variable del soma, a partir de una prolongación más o menos gruesa y relativamente corta (figura 4.4 G). Tal como se ve en la fotografía G, la prolongación vítrea emite las prolongaciones de la cabellera en un punto, sin que se pueda distinguir cual de las prolongaciones era la prolongación original. Algunas células presentan varias cabelleras que se originan a partir de 2 ó 3 prolongaciones que, o bien surgen directamente del soma (figura 4.4 H, I) o bien surgen de la bifurcación de una única prolongación que parte del soma (figura 4.4 J, K). Algunas células que tienen la cabellera saliendo de un punto de la prolongación vítrea a cierta distancia del soma, muestran alguna prolongación fina entre el soma y el punto de emisión de la cabellera. En otras células hemos observado que de la parte de la prolongación ventricular que atraviesa la CNI parte una prolongación accesoria que también da origen a una cabellera (figura 4.4, asterisco en L). Las cabelleras originadas a partir de las prolongaciones accesorias surgen aproximadamente al mismo nivel que la cabellera principal. Las prolongaciones que forman la cabellera no son muy ramificadas, tal y como se puede apreciar en las células que han quedado mejor extendidas, como en J y K, de la figura 4.4. Las ramificaciones se dan sobre todo a cierta distancia del punto de emisión, por lo que pensamos que la mayoría están aproximadamente a nivel de la CCG.

4.2.3 Resumen

El estudio comparativo de las formas obtenidas por disociación de retinas de estadios comprendidos entre E8 y el adulto, con las formas conocidas por los estudios de otros autores y por nosotros mismos, indica que la célula de Müller, durante su diferenciación morfológica, pasa por tres fases, caracterizadas por: 1) emisión de *sprouting* generalizado, 2) emisión de prolongaciones desde el extremo distal de la prolongación vítrea mediante conos de crecimiento y 3) emisión de prolongaciones desde la porción proximal de la prolongación vítrea y formación de prolongaciones en el extremo distal de la prolongación ventricular, sin conos de crecimiento aparentes. El proceso de diferenciación morfológica de las células de Müller se esquematiza en la figura 4.5.

Las células adultas disociadas revelan una gran variabilidad estructural en la porción distal de la prolongación ventricular, así como diferentes formas respecto al lugar de origen de la cabellera vítrea, desconocidas hasta ahora. Nuestros resultados abren nuevas incógnitas

sobre el significado biológico de la variedad de formas adultas de estas células.

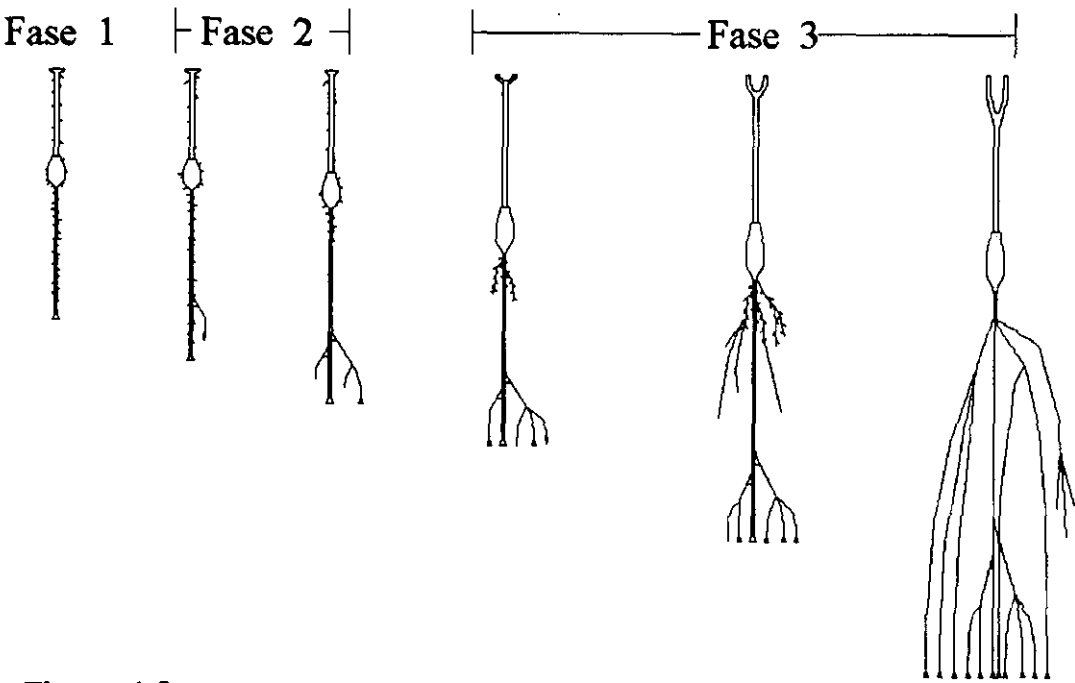


Figura 4.5

Esquema de la diferenciación morfológica de la célula de Müller de pollo, en el que representamos las formas características de las tres fases que hemos distinguido en este proceso.

4.3 CUANTIFICACION DEL INCREMENTO DE LA SUPERFICIE DE MEMBRANA DE LA CELULA DE MULLER A LO LARGO DEL DESARROLLO

La célula de Müller incrementa paulatinamente su superficie de membrana a lo largo del desarrollo embrionario mediante la emisión de prolongaciones. Nos planteamos cuantificar el incremento de superficie de membrana que experimenta la célula desde que abandona el ciclo en forma bipolar sencilla hasta que presenta la forma compleja adulta, proceso que se esquematiza en la figura 4.6. Abordamos el problema de forma sencilla con un enfoque geométrico, modelizando la célula de forma que pudiésemos utilizar el mismo modelo para cualquier forma de las que va adoptando la célula durante su diferenciación.

4.3.1 Desarrollo del método de cálculo de la superficie celular

En la figura 4.6 mostramos en representación idealizada las formas embrionaria y adulta de la célula de Müller de pollo. Puede observarse que en ambos casos la célula se puede considerar formada por fragmentos en forma de cilindro y en forma de tronco de cono. Así, el valor de la superficie de membrana de una célula de Müller sería igual a la

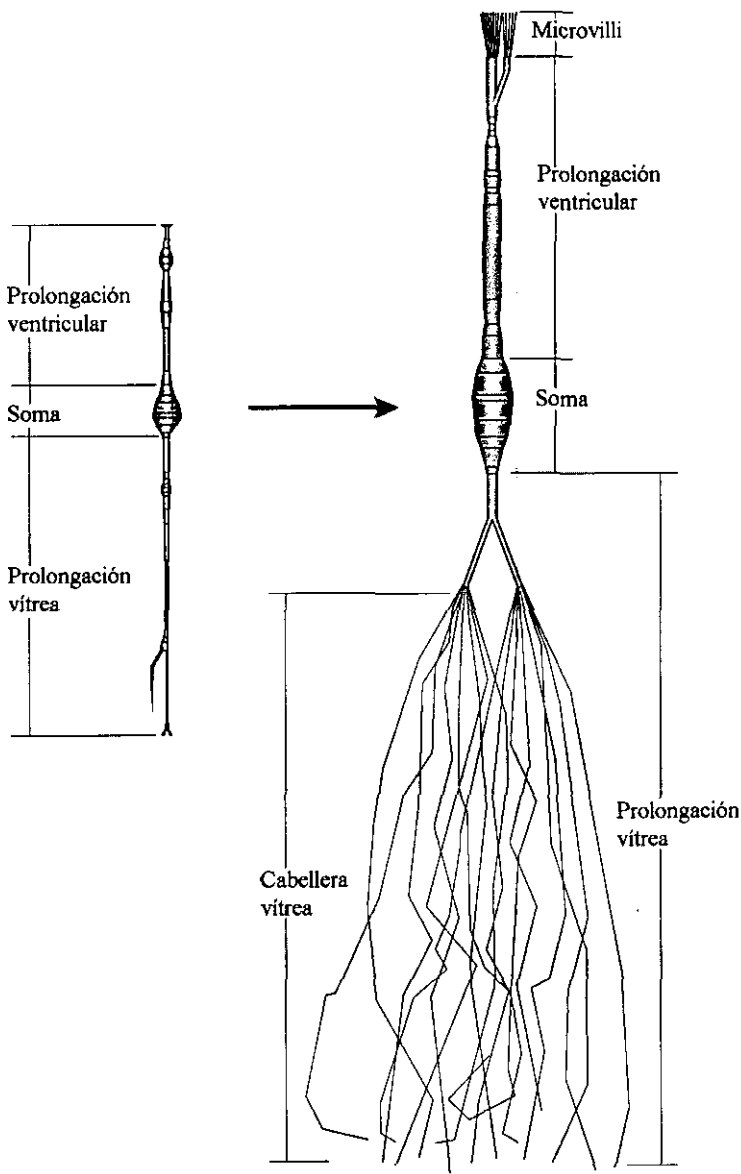


Figura 4.6

Representación modelizada de una célula de Müller en fase inicial de diferenciación, disociada de retina de E13 (izquierda), y una de retina adulta (derecha). Ambas células se han dibujado aproximadamente a la misma escala, para mostrar el crecimiento espectacular de esta célula durante su diferenciación.

suma de las áreas laterales de cada uno de estos fragmentos individuales. Por tanto, una forma de medir la superficie sería descomponer cada célula en fragmentos en forma de cilindro y de tronco de cono, calcular el área lateral de cada uno de estos fragmentos y sumarla. Para calcular estas áreas aplicamos las fórmulas matemáticas:

1) *Area lateral de un cilindro:* $A_{cil} = 2\pi Rh$,

siendo R el radio del cilindro y h su longitud (figura 4.7).

2) *Area lateral de un tronco de cono:* $A_{tc} = \pi G(R+r)$,

siendo R y r los radios mayor y menor del tronco de cono y G la generatriz (figura 4.7).

Ahora bien, este método sería muy largo y tedioso. Por ésto, decidimos buscar una fórmula que sirviera para calcular la superficie de figuras complejas formadas por cilindros y troncos de cono y aplicarla a las células de Müller. Considérese un cuerpo como el mostrado en la figura 4.8. Se trata de un sólido de revolución formado por porciones en forma de cilindro, de cono y de tronco de cono.

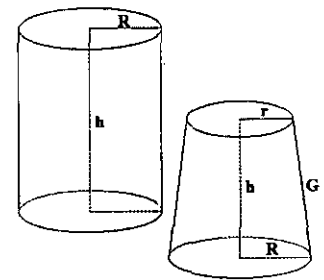


Figura 4.7

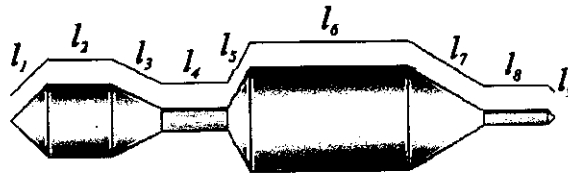


Figura 4.8

El área lateral total de este cuerpo será igual a la suma de todas las áreas laterales de los cilindros y troncos de cono que la forman. Así, generalizando para cualquier figura:

$$3) \quad A_T = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \sum_{i=1}^n A_i$$

Si ahora utilizamos la fórmula de las áreas del cilindro y el tronco de cono en función del diámetro, en vez del radio:

$$4) \quad A_{cil} = \pi D h ; \quad A_{tc} = \pi \frac{D+d}{2} G$$

Nótese que los valores que toman tanto G como h en esta expresión corresponden a las longitudes l_1, l_2, \dots, l_n (figura 4.8) que denominaremos longitudes laterales (L).

Además, se puede demostrar que la expresión

$$5) \quad \frac{D+d}{2} ,$$

que aparece en la fórmula del área del tronco de cono, es su diámetro promedio (D_p); es decir, si medimos diámetros al azar en diferentes puntos del tronco de cono, el promedio de los valores obtenidos se aproxima al valor de esta expresión tanto más cuanto mayor es el número de medidas que tomemos. Por otra parte, no requiere demostración que el diámetro de un cilindro es igual a su diámetro promedio. Introduciendo en las ecuaciones 1 y 2 los valores de diámetro promedio y longitudes laterales, tenemos que ambas expresiones son iguales:

$$6) \quad \begin{aligned} A_{cil} &= \pi D_p L \\ A_{tc} &= \pi D_p L \end{aligned}$$

Luego el área lateral total de una figura como la mostrada en la figura 4.8 sería:

$$7) \quad A_T = \sum_{i=1}^n \pi d_{pi} l_i = \pi \sum_{i=1}^n d_{pi} l_i ,$$

siendo d_{pi} el diámetro promedio de cada segmento, y l_i la longitud lateral de cada segmento.

Esta expresión es equivalente a:

$$8) \quad A_T = \pi D_p \sum_{i=1}^n l_i ,$$

siendo D_p el valor del diámetro promedio de toda la figura. Si despejamos D_p en 8), tenemos que su valor es:

$$9) \quad D_p = \frac{A_T}{\pi \sum_{i=1}^n l_i} ,$$

y sustituyendo A_T por la expresión 7), queda que:

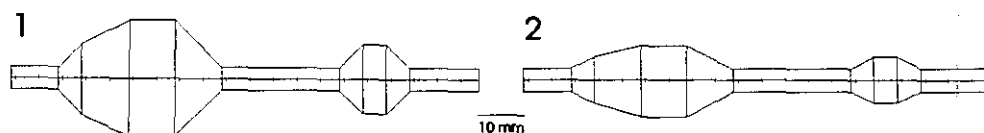
$$10) \quad D_p = \frac{\sum_{i=1}^n l_i d_{pi}}{\sum_{i=1}^n l_i}$$

Este valor puede calcularse exactamente para cualquier figura de la que conozcamos sus dimensiones: el diámetro promedio y la longitud lateral de cada segmento, es decir, d_{pi} y l_i . A él contribuyen los diámetros promedio de cada una de las regiones (cilíndricas o en forma de tronco de cono) de la figura proporcionalmente a su longitud lateral.

Para hallar una estimación del valor D_p de una figura como la de nuestro ejemplo (figura 4.8), de la que no conocemos sus dimensiones exactas, se pueden tomar puntos aleatoria o sistemáticamente en el eje de simetría de la figura y realizar mediciones de los diámetros que pasan por esos puntos. Este procedimiento implica que la contribución del diámetro promedio de cada región (d_{pi}) al diámetro promedio de toda la figura (D_p) es proporcional a la longitud de cada región. Es decir, las regiones largas contribuyen más al D_p que las cortas. Este procedimiento sería correcto para las regiones cilíndricas, en las que h coincide con l , pero no para las regiones con forma de tronco de cono, en las que no coinciden. Es más correcto hacer un muestreo, aleatoria o sistemáticamente, tomando puntos en la línea que marca el perímetro de la figura, y promediar los diámetros que pasan por esos puntos. Aunque este último es el modo más correcto de calcularlo, la diferencia entre los valores que se obtienen con uno y otro método de muestreo es muy pequeña y depende de la forma de cada figura en concreto. En general, cuanto menores son los ángulos entre las generatrices de los troncos de cono y la línea media, más se acercan los valores que se obtienen con uno y otro método de muestreo; es decir, el muestreo en la línea media es más aproximado para figuras con un perfil "suave", con ángulos poco abruptos, como sin duda ocurre con nuestras células. En el cuadro 1 mostramos dos ejemplos prácticos de figuras del tipo que estamos considerando, que prueban la bondad de estas aproximaciones.

Cuadro 4.1

Mostramos dos figuras que representan las proyecciones de sólidos de revolución formados por la unión de regiones cilíndricas y troncos de cono.



Estas dos figuras se diferencian únicamente en que los ángulos formados por las generatrices de los troncos de cono son en la figura 1 el doble que en la 2. Como conocemos todas las dimensiones de estas figuras, podemos calcular en ellas los valores exactos de todos los parámetros que aparecen en la fórmula 8, así como su área exacta:

Figura 1: $L = 121.535 \text{ mm}$ (sumando las l_i , conocidas)
 $D_p = 11.296 \text{ mm}$ (aplicando la fórmula 10))
 $A_{\text{real}} = 4313 \text{ mm}^2$ (aplicando las fórmulas 1) y 2))

Si medimos diámetros muestreando sistemáticamente en la línea media de la figura cada cinco milímetros, tomando como primer punto el situado a 1 mm del comienzo de la figura, como se indica en los dibujos, el diámetro promedio estimado, y el área estimadas serían:

$$D_{\text{Pest}} = 11.09 \text{ mm}$$
$$A_{\text{est}} = 4234.66 \text{ mm}^2$$

El error existente entre las dos medidas es:

$$A_{\text{est}}/A_{\text{real}} = 0.982$$

Veamos estos mismos valores para la figura 2, que tiene un perfil más "suave":

Figura 2: $L = 103.26 \text{ mm}$
 $D_p = 7.91 \text{ mm}$
 $A_{\text{real}} = 2565.02 \text{ mm}^2$
 $D_{\text{Pest}} = 7.88 \text{ mm}$
 $A_{\text{est}} = 2554.66 \text{ mm}^2$
 $A_{\text{est}}/A_{\text{real}} = 0.995$

Así pues, los errores de la estimación son muy bajos en ambos casos, siendo el menor el de la figura 2, como era esperable.

4.3.1.1 Método para la estimación de la superficie de la célula adulta

En la célula adulta hemos considerado dos regiones con distintas morfologías: la región de la cabellera vítrea y la región que comprende todo el resto de la célula, ésto es, la prolongación ventricular, el soma y la porción de la prolongación vítrea hasta el punto donde se inicia la cabellera (figura 4.6). Excluimos la región del *microvilli*, por razones que se verán más adelante.

La región de la cabellera vítrea está formada por numerosas prolongaciones largas y delgadas, cuyo diámetro varía poco a lo largo de cada prolongación y entre ellas. El resto de la célula se puede considerar que está formada por la unión de numerosos fragmentos cilíndricos y tronco-cónicos, cada uno de ellos con una longitud y un radio determinados.

Para calcular en la práctica el valor aproximado de la superficie de las células de Müller adultas las dibujamos con ayuda de un ordenador. Extensiones de células disociadas y fijadas con EFA se montaron con cubreobjetos y agua destilada, y se observaron con un microscopio Zeiss por contraste de fases y objetivo de 40x. La imagen era capturada por una videocámara y exportada a un ordenador. Sobre la imagen en pantalla y utilizando el programa Neurolog trazamos todo el contorno de la célula, excepto en la región de la cabellera vítrea, en la cual las prolongaciones son demasiado finas para dibujar el contorno, de modo que dibujamos sólo su longitud. El programa mide la longitud de todas las líneas trazadas y produce un dibujo de la célula con un aumento conocido (1000x), que obtenemos a través de impresora. La región del *microvilli* se despreció, pues estas prolongaciones son tan finas (aproximadamente $0.2\mu\text{m}$, según las ilustraciones de microscopía electrónica de Prada, F. y col, 1989b) que es muy difícil no ya medirlas, sino incluso contarlas. En la figura 4.9 mostramos la fotografía de una célula de Müller y la imagen de la misma generada con ayuda del ordenador. Si asumimos que las células quedan adheridas al porta conservando su volumen, lo que estamos viendo de ellas es su proyección sobre un plano (observando las células con el microscopio a grandes aumentos vemos que hay varios planos de foco, lo que nos indica que conservan, al menos parcialmente, su volumen). Se aumentó el dibujo un número conocido de veces (2.8x), para facilitar las mediciones. Primero calculamos la superficie en conjunto de la prolongación ventricular, el soma y la porción de la prolongación vítrea hasta el inicio de la cabellera, para lo cual sobre el dibujo aumentado trazamos la línea media de la figura y medimos el diámetro de la célula

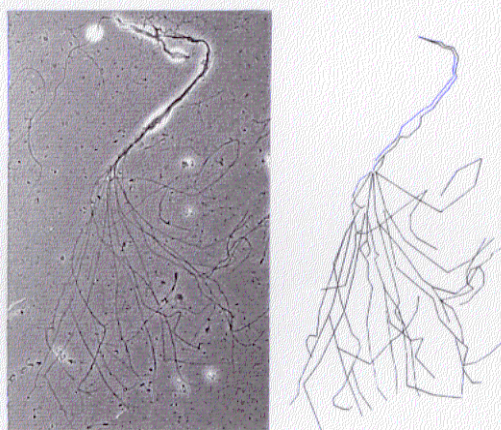


Figura 4.9

Mostramos, para su comparación, una microfotografía de una célula de Müller adulta disociada y fijada con EFA, así como el dibujo de la misma generado por ordenador, usado para calcular su superficie. Aumento: 240x.

trazando perpendiculares a esta línea a intervalos fijos (5mm en el dibujo, $1.8\mu\text{m}$ sobre la célula). Promediando todas las medidas, obtuvimos el valor del diámetro promedio, es decir, D_p en la ecuación 8. El perímetro de la célula en esa región nos lo proporcionaba el ordenador. Como sea que en esta zona las células son muy largas en relación a la anchura, el valor del perímetro se aproxima mucho al doble del valor del sumatorio de l_i que aparece en la ecuación 8. Por tanto, podemos aplicar esta ecuación, puesto que tenemos buenas estimaciones de las dos incógnitas de la misma.

Para calcular la superficie de la cabellera podemos aplicar la misma fórmula. Obtendríamos el mismo resultado si hallamos las áreas de cada prolongación y las sumamos, que si consideramos un cuerpo formado por la unión de todas las prolongaciones de la cabellera y calculamos su área. En este último caso el sumatorio de longitudes es la suma de las longitudes de todas las prolongaciones, valor que nos proporciona el ordenador. El problema es que no podíamos dibujar el contorno de estas prolongaciones tan finas, por lo que no podíamos calcular el diámetro promedio del mismo modo que para las porciones gruesas de la célula. Dada esta dificultad y que la simple observación nos indicaba que el grosor de las prolongaciones finas es prácticamente el mismo en toda su longitud, y que además no se aprecia variación sustancial del mismo entre las prolongaciones de una misma célula, ni de unas células a otras (véanse las células F-L de la figura 4.4) decidimos no estimar el diámetro promedio de las prolongaciones para cada célula en particular, sino el valor promedio para todas las células. Ensayamos dos abordajes con el fin de comparar los resultados:

1- Con el objetivo de 100 aumentos fotografiamos prolongaciones vítreas de varias células de Müller seleccionadas al azar. Los negativos se ampliaron hasta dar un positivo con un factor de ampliación de 3850x. Tanto al microscopio como en los negativos se vio que el grosor de las prolongaciones estaba dentro del poder de resolución de éste [apertura numérica del objetivo: 1.3; apertura numérica del condensador: 0.9; filtro verde (longitud de onda: $0.55\mu\text{m}$); poder de resolución: $d = L.O/(A.n.obj + A.n.cond.) \approx 0.2037\mu\text{m}$]. Sin embargo, las prolongaciones eran aún demasiado finas para poder ser medidas sobre las fotografías, por lo que éstas se ampliaron en una fotocopidora hasta 5390.aumentos. No se aumentaron más para evitar pérdida de nitidez. Sobre estas copias y con papel vegetal se dibujaron pequeños tramos de las prolongaciones usando un portaminas. Estos dibujos aún se aumentaron en la fotocopidora hasta un total de 10565x. En estas ampliaciones pudimos medir fácilmente el

grosor, simplemente con una regla milimetrada, y hallamos el diámetro promedio.

2- Con el objetivo de 100x y la cámara clara dibujamos pequeños tramos de las prolongaciones con un portaminas fino. El aumento de estos dibujos era de 1912x. Aumentamos en la fotocopidora hasta 15000x como en el caso anterior y medimos el grosor.

El valor de diámetro promedio que obtuvimos para estas prolongaciones mediante el uso de la cámara de dibujo fue de $0.48\mu\text{m}$ ($n=79$). Utilizando ampliaciones fotográficas en vez de dibujos obtuvimos 2 medidas: $0.42\mu\text{m}$ ($n=127$) y $0.471\mu\text{m}$ ($n=136$). Véase que las medidas obtenidas por ambos métodos son muy similares, lo que nos da confianza sobre su validez. El valor que tomamos como diámetro promedio para nuestros cálculos fue la media ponderada de estas tres medidas, que es $0.45\mu\text{m}$.

4.3.1.2 Método para la estimación de la superficie de las células embrionarias

Para medir las células embrionarias no hicimos uso del ordenador, puesto que la mayor utilidad de éste era facilitarnos la longitud total de las prolongaciones de la cabellera. En las células más jóvenes no se ha formado la cabellera, por lo que no nos pareció que valiera la pena emplearlo. Puesto que las células embrionarias van modificando su forma a lo largo del desarrollo, en cada estadio presentan una forma ligeramente diferente al anterior y, debido a que el proceso de morfogénesis no es sincrónico en cada estadio, en los disgregados encontramos una mezcla de células de Müller cuyas formas presentan un grado variable de complejidad. Por ésto cada célula fue estudiada y medida por separado. Para ello fotografiamos células de preparaciones fijadas con EFA de los estadios E13, E15, E17 y E19 con el objetivo de 40x. Los negativos se proyectaron en la ampliadora a un aumento de 8.1x sobre una hoja de papel blanco, en la cual se dibujó cuidadosamente el contorno de la célula, poniendo especial cuidado en las prolongaciones más finas (figura 4.10). Como sea que las células embrionarias pueden también modelizarse como compuestas por cilindros y troncos de cono, aplicamos las mismas fórmulas

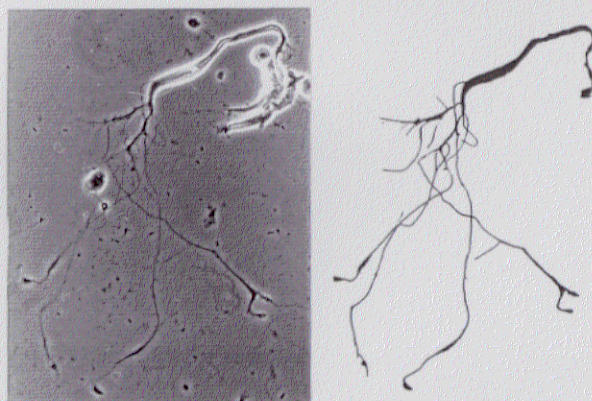


Figura 4.10

Mostramos, para su comparación, la fotografía de una de las células de Müller embrionarias (E19) que se han medido, con el dibujo obtenido a partir del negativo ampliado de ésta. Aumentos:440x.

matemáticas que para las células adultas. Los dibujos se aumentaron en la fotocopidora 3.95 veces, por lo que el aumento total de las células, teniendo en cuenta el aumento del microscopio, fue de 6387x. Sobre las ampliaciones se tomaron medidas de los diámetros promedios de las prolongaciones y de las longitudes de las mismas. Las prolongaciones del mismo grosor aproximado se agruparon y se midieron conjuntamente. De este modo, obtuvimos los datos para aplicar la ecuación, como hemos visto para las células adultas.

4.3.2 Valores de la superficie de la célula entre E13 y el adulto

Por lo laborioso del proceso de cálculo de la superficie no hemos realizado un estudio estadístico, sino que en cada estadio hemos medido la superficie de 3 ó 4 células características del mismo. En la figura 4.11 mostramos, a la misma escala, una de las células medidas representativa de cada estadio, aquella cuya área se acerca más al valor medio del área en ese estadio (tabla 4.2).

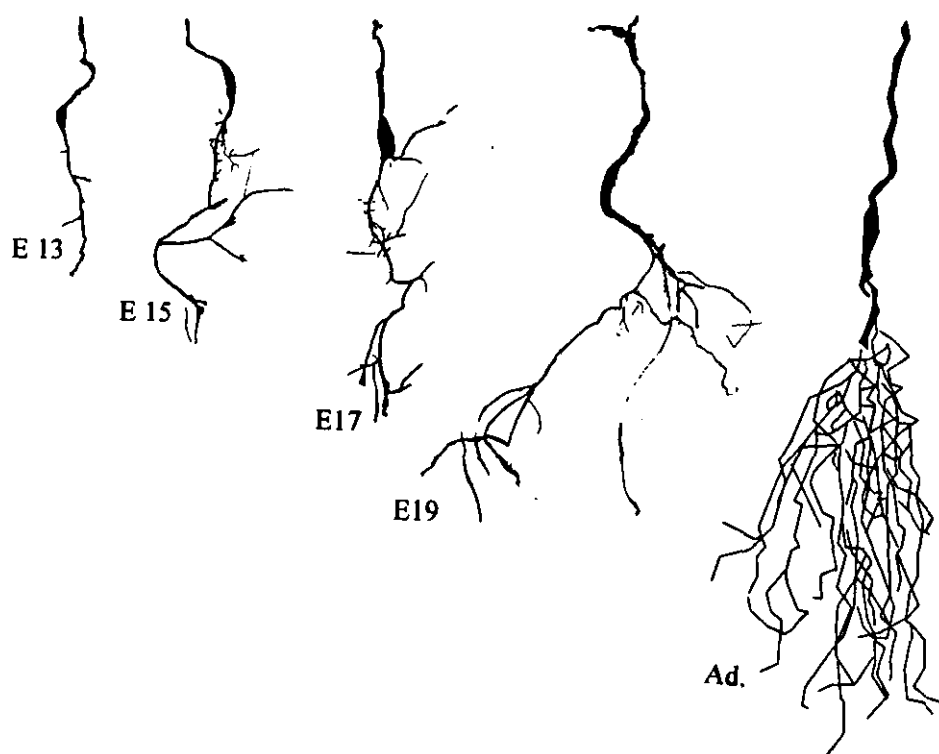


Figura 4.11

Dibujo de células representativas del estadio indicado, cuya superficie es la más cercana al valor medio de la superficie de las células medidas en cada estadio. pve: prolongación ventricular; s: soma; pvi: prolongaciones vítreas. Aumento: 450x.

En la tabla mostramos el área de todas las células medidas y el valor medio del área que resulta en cada estadio de desarrollo. Estos resultados indican que la célula incrementa su superficie más de 10 veces desde que presenta forma bipolar sencilla hasta que adquiere la forma adulta compleja. Entre E13 y E19 la célula triplica su superficie cada 4 días.

Tabla 4.2

ESTADIO	SUPERFICIE DE CADA CELULA (μm ²)	SUPERFICIE MEDIA (μm ²)
E13	196.1	211.2
	197.6	
	240.1	
E15	328.1	400.7
	340.8	
	442.9	
	490.9	
E17	551.7	569.4
	555.4	
	579.5	
	591.1	
E19	970	1261.2
	1024.5	
	1229.4	
	1821	
ADULTO	2467.9	2948.5
	2754.5	
	3149.3	
	3422.1	

En la modelización de la célula distinguimos claramente dos porciones; por un lado la prolongación o prolongaciones vítreas, muy finas en todos los estadios, y por otro el resto de la célula, es decir, la prolongación ventricular y el soma, con un mayor grosor. Hemos analizado cómo contribuye cada una de las dos porciones al incremento total de la superficie

celular. En la tabla 4.3 vemos cómo va variando la superficie de cada porción de la célula, así como la contribución de cada porción al área total.

Tabla 4.3

A_{Pve} : área media (en μm^2) de la prolongación ventricular más el soma; FI_{Pve} : factor de incremento del área media de la prolongación ventricular entre estadios; A_{Pvi} e FI_{Pvi} son los parámetros anteriores calculados para la prolongación vítrea; $\%_{Pve}$ y $\%_{Pvi}$: porcentaje del área total de la célula que corresponde a la prolongación ventricular y a la vítrea respectivamente.

ESTADIO DE DESARROLLO	A_{Pve}	FI_{Pve}	A_{Pvi}	FI_{Pvi}	$\%_{Pve}$	$\%_{Pvi}$
13	142.7	-	68.5	-	67.6	32.4
15	167.2	1.17	233.5	3.41	41.7	58.3
17	259.5	1.55	309.9	1.33	45.6	54.4
19	513.1	1.98	748.1	2.41	40.6	59.4
ADULTO	659.6	1.28	2288.9	3.06	22.4	77.6

La superficie de la porción ventricular crece moderadamente respecto a la vítrea en todo el período de desarrollo estudiado, pues mientras aquélla incrementa su superficie 4.6 veces ésta la incrementa 33.4 veces. En E13 el 68% de la superficie celular corresponde a la porción ventricular, mientras que el 32% corresponde a la vítrea. Esto se corresponde con la diferencia de grosor de ambas porciones, ya que la porción vítrea está formada por una prolongación poco ramificada, más fina que la prolongación ventricular y el soma. En E15 la porción vítrea contribuye más que la ventricular al área total (58% frente a 42%), debido a que el incremento en superficie que experimenta esta porción (3.4 veces) es mayor que el que experimenta la porción ventricular (1.2 veces). Entre E15 y E17 y entre E17 y E19, el incremento en superficie es similar para ambas porciones, por lo que la contribución relativa de cada porción al área total de la célula se mantiene en valores aproximados durante estos estadios. En el adulto la porción vítrea contribuye en un 78% a la superficie total, mientras que la ventricular sólo lo hace en un 22%. Es debido a que mientras la prolongación ventricular apenas incrementa su superficie desde E19 (1.3 de incremento), la porción vítrea la triplica. Nuestros resultados indican que, en total, el incremento en superficie de la porción vítrea entre E13 y adulto es 7.2 veces superior al de la ventricular. Así, mientras la superficie de las prolongaciones vítreas crece de una forma muy rápida, debido a la elongación y,

fundamentalmente, al aumento en el número de prolongaciones de la cabellera, el resto de la célula tiene un ritmo de crecimiento en superficie más moderado, resultado de la elongación y el engrosamiento de la prolongación ventricular y el soma.

Los resultados de la tabla 4.3 se presentan en la figura 4.12, en la cual se aprecia de forma gráfica la distinta dinámica de crecimiento en superficie de las dos porciones de la célula consideradas, así como el crecimiento total de la célula.

4.3.3 Resumen

Hemos desarrollado un método geométrico para calcular la superficie de las células de Müller dissociadas y extendidas en portas. Mediante este método hemos calculado la superficie de membrana de estas células desde E13 hasta el adulto. En este período la célula incrementa su superficie de membrana más de 10 veces. Aunque el área de la prolongación ventricular experimenta un incremento considerable (aumenta más de

4 veces), el mayor incremento es debido a la prolongación vítrea, cuya superficie incrementa en más de 30 veces, debido fundamentalmente a la formación de las múltiples prolongaciones de la cabellera. El porcentaje de superficie de la prolongación vítrea con respecto a la superficie total de la célula aumenta desde el 30% en E13 hasta más del 75% en el adulto. Por lo tanto, el crecimiento en superficie de la célula de Müller tiene lugar a expensas, fundamentalmente, de la parte vítrea de la célula.

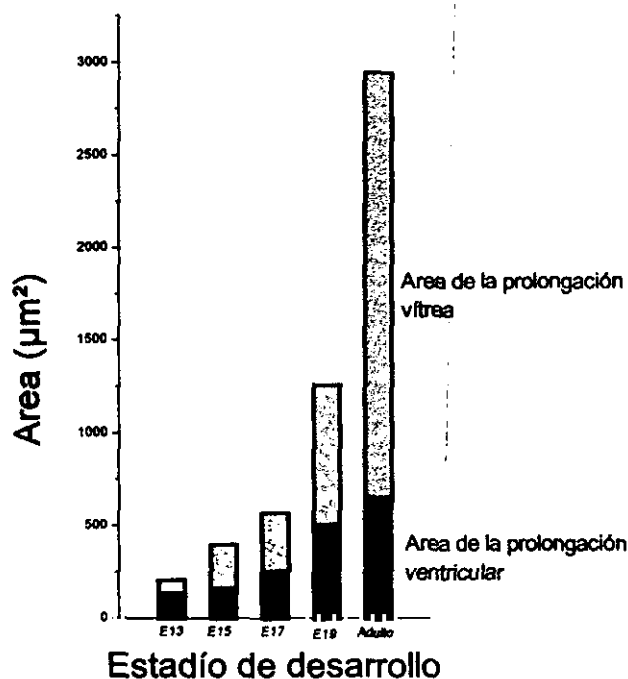


Figura 4.12

Representación gráfica del crecimiento del área de la prolongación ventricular (barras en negro) y de la vítrea (barras sombreadas) de la célula de Müller respecto al estadio de desarrollo. La altura total de cada barra representa el área media para cada estadio.

4.4 EXPRESION DE MOLECULAS DEL CITOESQUELETO DE LAS CELULAS DE MULLER

4.4.1 Desarrollo de un método de inmunocitoquímica para el estudio del citoesqueleto de las células disgregadas

El primer problema que tuvimos que resolver fue de fijación celular. Se trataba de encontrar un fijador que preservase la adhesión de las células a una matriz extracelular, así como las formas de las células disgregadas. La mayoría de protocolos de fijación para inmunocitoquímica disponibles en la literatura se han desarrollado para células cultivadas, las cuales están fuertemente adheridas a una matriz extracelular y, por lo tanto, difícilmente se pierden durante el proceso. Las células disociadas y extendidas sobre una matriz aplicada a un porta se adhieren lábilmente a la matriz. Nosotros teníamos que encontrar un fijador que reuniera los siguientes requisitos:

- 1.-Adhesión firme de las células a una matriz.
- 2.-Conservación de la morfología de las células.
- 3.-Preservación adecuada de los antígenos reconocidos por los anticuerpos elegidos para nuestro estudio.

Tuvimos que realizar numerosos ensayos antes de encontrar los fijadores que necesitábamos. Los primeros experimentos los hicimos fijando con etanol-ácido acético 3:1 (EA) y con EFA, porque eran los fijadores que más habíamos empleado para fijar extensiones de células sobre portas, y además habíamos encontrado que proporcionan el máximo de adhesión de las células al porta y de preservación morfológica de las mismas. Desafortunadamente, resultaron inadecuados para preservar los antígenos que reconocen nuestros monoclonales. A continuación ensayamos el PFA al 4%, sin duda el fijador más empleado para inmunotinciones. Sin embargo, este fijador no adhería las células disgregadas a los portas sobre los que aplicamos gelatina o laminina o poli-L-lisina (las matrices más usadas). Conseguimos la adhesión centrifugando las células sobre cubreobjetos gelatinados, con la metodología indicada en el apartado de material y métodos (apartado 3.2.2). En estas condiciones el PFA fija las células conservando la morfología aceptablemente (aunque no de manera óptima como lo hacen el EA o el EFA) y el monoclonal 3CB2 marca intensamente el antígeno. Sin embargo, con este fijador no funcionaba ni el anti β -actina ni el anti α -tubulina. Así pues, buscamos otros fijadores que fueran idóneos para el marcaje con estos

anticuerpos y preferiblemente también para el monoclonal 3CB2, con el fin de poder realizar dobles inmunotinciones con todos ellos. En la siguiente tabla (tabla 4.4) resumimos los fijadores empleados y los resultados obtenidos.

Tabla 4.4

PRESERVACION MORFOLOGICA: -- muy mala; - mala; + buena; ++ muy buena.
Columnas de ANTICUERPOS: / marcaje inespecífico; - negativo; -+ trazas; + positivo.

FIJADOR	PRESERVACION MORFOLOGICA	ANTICUERPOS		
		3CB2	ANTI β -ACT	ANTI α -TUB
EFA	++	/	-	-
EA	+	-	-	-
PFA	+	+	-	-
ZAMBONIS	+	+	-	-
PFA Y GLUTARALDEHIDO	++	/	+	+
METANOL Y ACETONA	--	-	-	-
ETANOL EN TAMPON GLICINA	-	-+	-+	-

El EFA y el EA se usaron ambos entre 15 y 60 minutos a temperatura ambiente, con iguales resultados a cualquier tiempo. El PFA al 4% se ensayó en PBS y en PB 0.1M, a pH 7.2-7.4, con y sin adición de Triton X-100, a 4°C durante 15 minutos ó a 37°C durante 10 minutos, obteniendo siempre resultados muy similares en todos los casos. También se ensayó el PFA al 4% en PB 0.1M suplementado con sacarosa hasta 300 mM. En este caso, la preservación de las células fue mucho peor, en contra de lo esperado. El fijador de Zambonis contiene un 15% de solución acuosa saturada de ácido pícrico en PFA al 2% en PB 0.1M. Se empleó a 4°C durante 15 minutos. Los resultados fueron muy similares a los obtenidos con PFA al 4% solo. El fijador adecuado para anti β -actina y anti α -tubulina resultó ser una mezcla de glutaraldehido al 0.2% y PFA al 3%. El PFA se usó siempre al 3%, pero el glutaraldehido se ensayó al 2, 0.2, 0.1 y 0.05%. Los mejores resultados para α -tubulina y β -actina se consiguieron con 0.2% de glutaraldehido, a 37°C durante 10 minutos ó a 4°C durante 15 minutos. El 3CB2 no funcionó con ninguna concentración de glutaraldehido. La fijación con metanol y acetona se hizo a -20°C, sumergiendo los cubres con las células 10

minutos en metanol y 1 minuto en acetona. La mayoría de las células se pierden en el proceso de fijación. También ensayamos etanol en tampón glicina a pH 2.2 durante 20 minutos, tanto a -20°C como a 4°C. La preservación morfológica, aunque mala, resultó ser ligeramente mejor a -20°C.

En conclusión, PFA al 4% es el fijador más adecuado para marcar 3CB2, mientras que una mezcla de PFA al 3% y glutaraldehído al 0.2% es el fijador idóneo para marcar α -tubulina y β -actina.

4.4.2 Expresión de 3CB2

Ya conocíamos por el trabajo de Prada, F. y col. (1995) que 3CB2 se expresa en el tubo neural del pollo y se detecta en retina desde el inicio de la formación de la copa óptica. En E3 todo el neuroepitelio de la retina aparenta estar marcado en secciones, mientras que en E8 el marcaje queda supuestamente restringido a las células de Müller en retina central. En este trabajo hemos estudiado la expresión de la molécula reconocida por 3CB2 en la célula de Müller a lo largo del desarrollo y en animales adultos, prestando especial atención a su distribución intracelular. Comenzamos nuestro estudio en E6, a pesar de que en este estadio las células son difíciles de disgregar, porque algunas células de Müller ya han abandonado el ciclo celular (Prada, C. y col., 1991) y esperábamos identificarlas con el marcador. En este estadio prácticamente todas las células, tanto las completamente disgregadas como las integrantes de tejido semidisgregado, están marcadas (figura 4.13 A, B). Las células marcadas son apolares, monopolares o bipolares (figura 4.13 A, B, C). Estas células son prácticamente todas células neuroepiteliales en ciclo, dado que el número de neuroblastos y glioblastos que han dejado el ciclo en este estadio es muy pequeño. Hemos observado que algunas células monopolares con la prolongación muy larga y fina (no mostradas), que identificamos como neuroblastos de ganglionares, expresan transitoriamente el antígeno (resultados no publicados). Hemos observado también que el patrón de distribución de la molécula en las células neuroepiteliales varía según la morfología celular. Las células bipolares suelen presentar marcaje en ambas prolongaciones, aunque a veces éstas no tienen la misma intensidad (figura 4.13, flechas en A y B y figura 4.13 C). En el soma el marcaje es tenue, casi inexistente, excepto en ciertos filamentos que bordean el núcleo en algunas células (figura 4.13, flecha fina en C). En las células monopolares la prolongación aparece marcada, pero en la región del soma la inmunorreactividad suele concentrarse en el polo opuesto al de salida

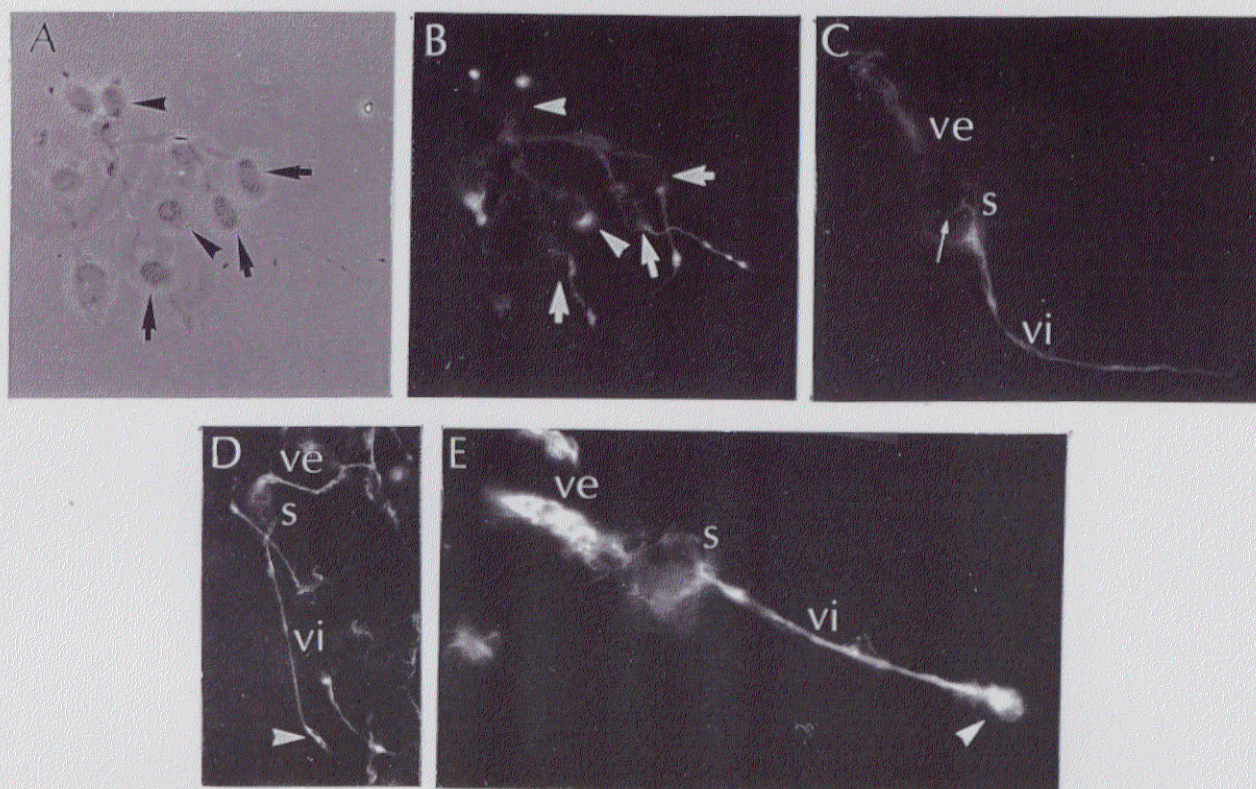


Figura 4.13

Expresión de 3CB2 en las células de retina en los estadios E6 (A-C) y E8 (D,E). A: fotografía por contraste de fases de un campo de células semidisgregadas; B: el mismo campo visto por inmunofluorescencia mostrando todas las células marcadas con 3CB2. Las **flechas** señalan típicas células neuroepiteliales bipolares; sus prolongaciones vítreas terminan en un cono de crecimiento. Las **cabezas de flecha** apuntan a células monopolares, con el marcaje acumulado en el polo del soma opuesto al de salida de la prolongación; C: célula bipolar mostrando filamentos inmunorreactivos (**flecha fina**) en el soma (s), prolongación ventricular (ve) y porción de la prolongación vítrea (vi) más próxima al soma; D: célula bipolar con la forma de los glioblastos de Müller más jóvenes observados en preparaciones de Golgi. La prolongación vítrea termina en un engrosamiento (**cabeza de flecha**); E: célula bipolar con ambas prolongaciones intensamente marcadas, cuya forma corresponde a la de una célula en fase G₁ del ciclo celular, en base al grosor de ambas prolongaciones y al cono de crecimiento (**cabeza de flecha**) en el que termina la prolongación vítrea, aunque cabe otra interpretación (véase texto). Aumentos: A, B y D: 650x; C y E: 1625x.

de la prolongación (figura 4.13, cabeza de flecha en A y B). Por lo tanto, la distribución de 3CB2 no es homogénea en la célula neuroepitelia. El procesamiento en paralelo de células de E6 con células de estadios subsiguientes muestra que la inmunorreactividad es menos intensa en E6 que en estadios posteriores.

En E8 el número de células marcadas es claramente menor que en E6, habiendo una considerable proporción de células no marcadas. Muchas de las células marcadas tienen formas bipolares simples (figura 4.13 D) que interpretamos como los glioblastos más jóvenes

de células de Müller, dado que 3CB2 queda restringido a estas células, como mostraremos más adelante. Estas células tienen una prolongación vítrea más fina y larga que la ventricular y termina en un ensanchamiento que se corresponde con el pie vítreo observado en preparaciones de Golgi. Sin embargo, algunas de las células bipolares marcadas pueden ser células neuroepiteliales en ciclo, puesto que en este estadio todavía hay proliferación celular, o bien células que han abandonado el ciclo y están determinadas a ser células de Müller (figura 4.13 E). En este estadio y hasta E10 también aparecen marcados axones de células ganglionares, los cuales se observan en pedazos semidisgregados de retina formando haces de fibras que se orientan en paralelo. También son inmunopositivos sus conos de crecimiento (no mostrados). Llama la atención que el *sprouting* generalizado que se observa claramente por contraste de fases en los glioblastos de E8 *in vivo* no aparece marcado con 3CB2.

A partir de E10 y hasta el adulto sólo aparecen marcadas las células de Müller. La única excepción la constituyen las células horizontales, cuyos terminales axónicos se marcan a partir de E14. En la figura 4.14 mostramos en contraste de fases (A) e inmunofluorescencia (B) el mismo campo de células semidisgregadas de retina de E12, en el que puede observarse que la proporción de células marcadas por 3CB2 es mucho menor que la de no marcadas. En la figura B se pueden contar como mucho 16 células marcadas, mientras que no es necesario contar en A para concluir que el número de células totales es bastante mayor. En B se observa que casi todas las células marcadas tienen forma bipolar, y tres de ellas (a, b, c), tienen claramente formas de glioblastos en fase 2 de diferenciación; es decir, con el extremo distal de la prolongación vítrea ramificado a partir del típico ensanchamiento triangular observado en las preparaciones de Golgi. Las células bipolares simples (algunas de ellas con porciones fuera de foco) son en su mayoría glioblastos jóvenes. Sólo alguna de ellas podría aún estar en ciclo, dado que en E12 queda sólo una pequeñísima fracción de células que incorporan timidina tritiada (Prada, C. y col., 1991). También se observan, aunque en pequeño número, células apolares y monopolares (cabezas de flecha) intensamente teñidas. Las interpretamos más bien como glioblastos de Müller que han perdido su prolongación por el proceso mecánico que como células en ciclo, en base a que es muy probable que en este estadio el número de células inevitablemente dañadas por el proceso mecánico de disociación supere al reducido número de células en ciclo.

Las figuras 4.14 y 4.15 muestran que el monoclonal 3CB2 marca el citoplasma de la célula de Müller en diferenciación en toda su longitud, y no marca el núcleo. La prolongación

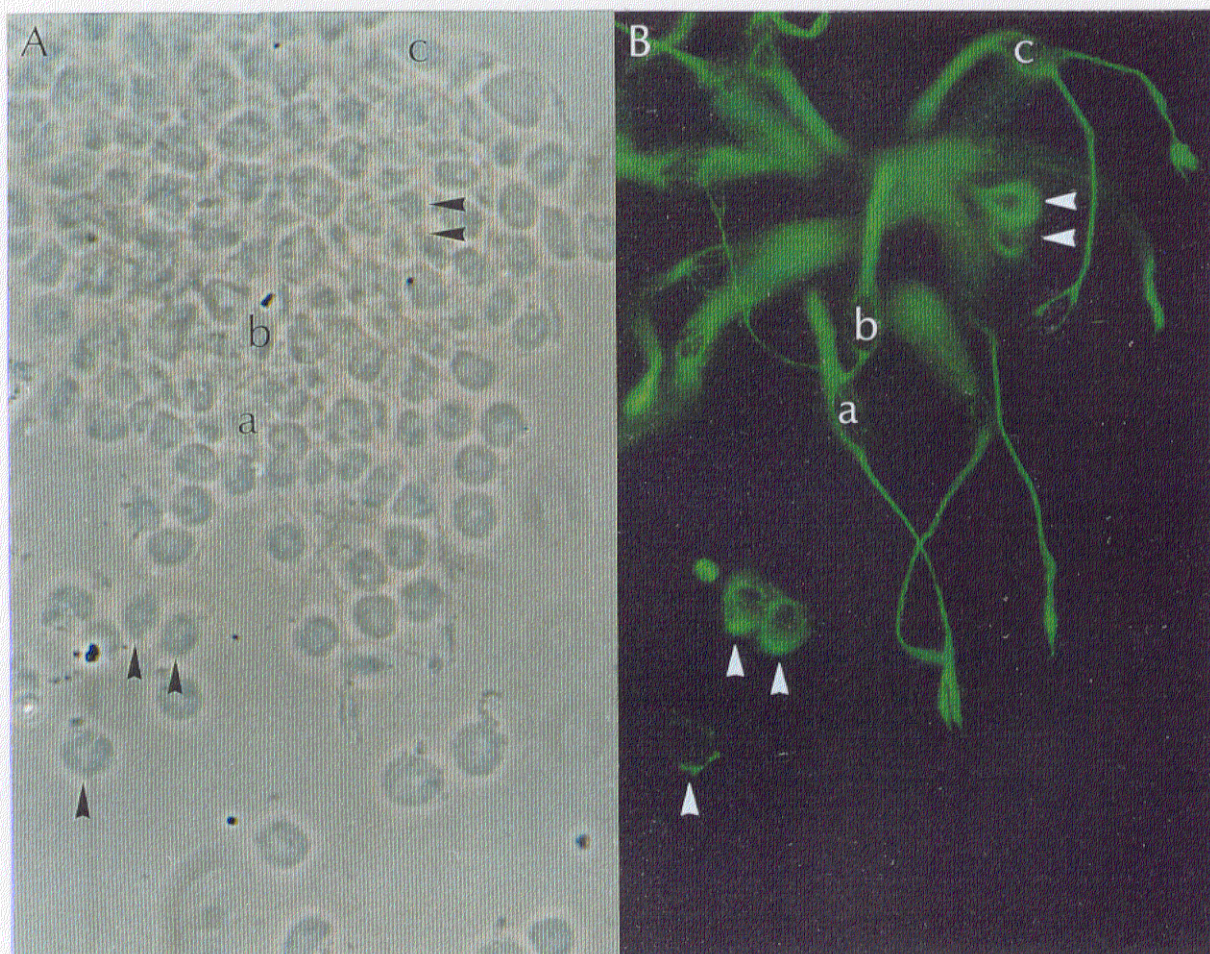


Figura 4.14

Fragmento semidisgregado de retina de E12, observado con óptica de contraste de fases (A) e inmunofluorescencia indirecta (B) para el monoclonal 3CB2, que muestra que en este estadio el antígeno reconocido por 3CB2 está restringido a las células de Müller. En contraposición al gran número de núcleos que aparecen en el contraste de fases, pertenecientes a las diversas células de la retina, en la inmunofluorescencia sólo aparecen marcadas unas pocas células que tienen formas de células de Müller en diferenciación. Las **letras a, b y c** marcan los somas de células de Müller con la prolongación vítrea ramificada y, por tanto, claramente en fase 2. El resto de células con formas bipolares son, muy probablemente, células de Müller en fase 1 de diferenciación. Las **cabezas de flecha** señalan formas apolares y monopolares, presumiblemente de células de Müller dañadas por el proceso mecánico de la disociación. Llama la atención la diferencia de nitidez de las formas celulares en A y B, debida a la incapacidad del contraste de fases para resolver las formas de las células, quizás por estar débilmente fijadas (PFA 4%). Aumentos: 850x.

vítrea aparece toda ella rellena de marcaje intenso, tanto en las células en fase 1 (figura 4.15 A) como en las células en fase 2 (figura 4.15 B-F), excepto cuando observamos a gran aumento y en zonas concretas, aplanadas, en las que se observan filamentos discretos (figura 4.15 F, G). En el soma y la prolongación ventricular es más fácil individualizar estos filamentos (figura 4.15 A, H, I).

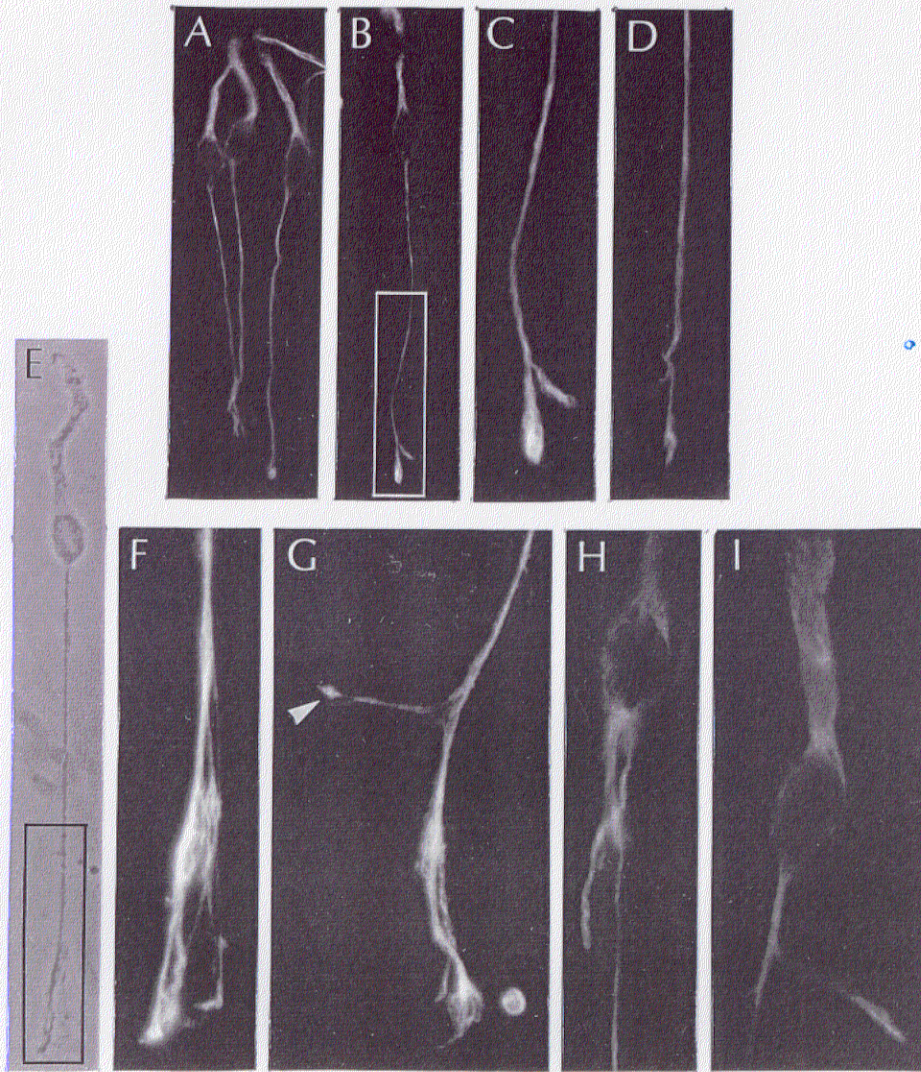


Figura 4.15

Algunos ejemplos de células de Müller marcadas con 3CB2 en E12 (A-D) y E15 (E-I). A: grupo de células de Müller con morfología bipolar simple, en fase 1 de diferenciación, con su prolongación vítrea sin ramificar. No aparece marcado ni se aprecia por contraste de fases (no mostrado) el *sprouting* generalizado característico de esta fase; B: célula de Müller en fase 2 de diferenciación. Una ampliación de la prolongación vítrea ramificada (zona en el recuadro) se muestra en C; D: detalle de la porción distal de la prolongación vítrea de una célula de Müller en fase 2; E: fotografía en contraste de fases de célula de Müller en fase 2. Una ampliación de la la parte distal de la prolongación vítrea (zona en el recuadro) se muestra en F, marcada con 3CB2; G: porción distal de la prolongación vítrea de una célula de Müller en fase 2; la **cabeza de flecha** señala una estructura con claro aspecto de cono de crecimiento en el extremo de una prolongación; H e I: células de Müller en fase 3 de diferenciación mostrando la emisión de prolongaciones a partir del polo vítreo del soma (H) o de zonas de la prolongación vítrea próximas a él (I). En I se observa, también, la prolongación ventricular, marcada con 3CB2. Aumentos: A, B y E: 650x; C, D, F, G, H e I: 1625x.

En la figura 4.15 B-D mostramos células en fase 2 de diferenciación del estadio E12 que indican que la primera prolongación lateral que emite la célula a nivel de CCG o CFNO está marcada con 3CB2. A menudo estas prolongaciones terminan en pequeños abultamientos, similares a conos de crecimiento, indicativos de que crecen por algún mecanismo que involucra a estas estructuras. La figura 4.15 E-G indica claramente que no sólo la primera prolongación, sino también otras que salen de la porción distal de la prolongación vítrea más proximales al soma, también se marcan con 3CB2 y crecen mediante conos de crecimiento (figura 4.15, cabeza de flecha en G). Las ilustraciones B-G muestran, por lo tanto, que las ramificaciones formadas en la porción distal de la prolongación vítrea en la fase 2 de diferenciación ya contienen 3CB2 desde que comienzan a emitirse. Las ilustraciones H e I muestran que las prolongaciones que emite la célula en la zona de la prolongación vítrea más cercana al soma también están marcadas, hecho que ilustramos más ampliamente en la figura 4.16 A-G. Aunque en el ápice de alguna de estas prolongaciones se puede observar un ligero engrosamiento, la mayoría de ellas suelen acabar filiformes, sin ninguna estructura que se asemeje a conos de crecimiento. Es frecuente encontrar que la zona de la que parten estas prolongaciones es ancha y de aspecto lameliforme.

En las inmunofluorescencias de pedazos de retina semidisgregados de estadios posteriores a E12 se comprueba que 3CB2 marca sólo células de Müller. La mayoría de células que aparecen en las disociaciones de retinas de E17 (figura 4.16 A-G) tienen la morfología característica de las células en la fase 3 de diferenciación. En estas células la distribución de la molécula marcada por 3CB2 es la misma que en estadios anteriores. En las ilustraciones A y B de esta figura se muestra un grupo de células en fase 3 cuyo marcaje es especialmente llamativo en los pies terminales vítreos y, en general, en la parte distal de la prolongación vítrea. La imagen en A se correlaciona estrechamente con el marcaje en secciones (Prada, F. y col., 1995), en las cuales la intensidad de marcaje de la célula es mayor en la CCG y CFNO que en el resto de las capas de la retina. Algunas de las prolongaciones de la parte distal de la prolongación vítrea no llegan a la MLI y terminan en estructuras similares a conos de crecimiento (figura 4.16, cabeza de flecha en A, B). Las ilustraciones C-G muestran células en fase 3, en las cuales se observa que las prolongaciones que se originan en el polo vítreo del soma de la célula (flecha en C, D, E), o en la porción de la prolongación vítrea proximal al soma (flecha en F) contienen 3CB2 desde el inicio de su formación, y son mayoritariamente filiformes, dando una imagen muy diferente a la de

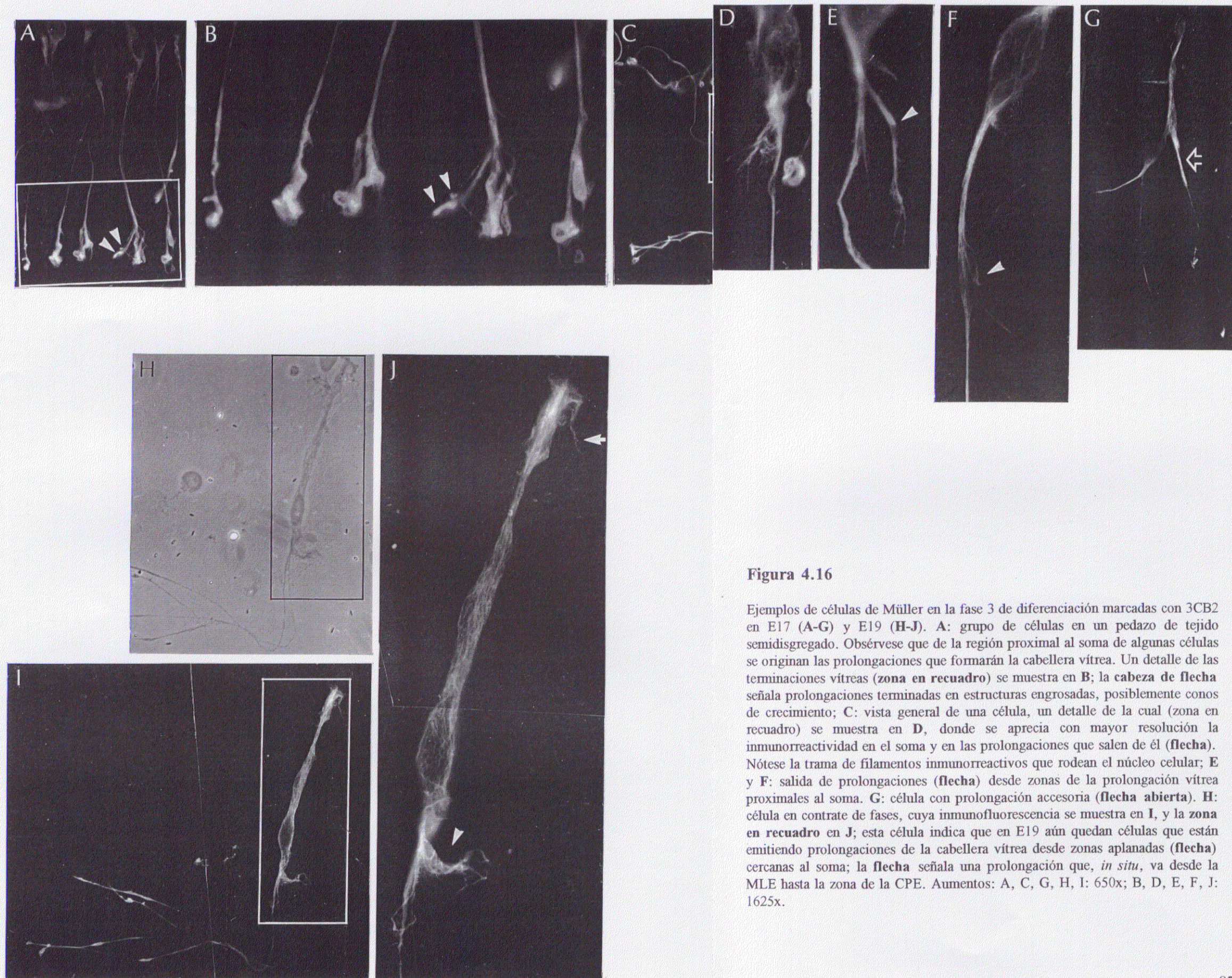


Figura 4.16

Ejemplos de células de Müller en la fase 3 de diferenciación marcadas con 3CB2 en E17 (A-G) y E19 (H-J). A: grupo de células en un pedazo de tejido semidisgregado. Obsérvese que de la región proximal al soma de algunas células se originan las prolongaciones que formarán la cabellera vítrea. Un detalle de las terminaciones vítreas (**zona en recuadro**) se muestra en B; la **cabeza de flecha** señala prolongaciones terminadas en estructuras engrosadas, posiblemente conos de crecimiento; C: vista general de una célula, un detalle de la cual (**zona en recuadro**) se muestra en D, donde se aprecia con mayor resolución la inmunorreactividad en el soma y en las prolongaciones que salen de él (**flecha**). Nótese la trama de filamentos inmunorreactivos que rodean el núcleo celular; E y F: salida de prolongaciones (**flecha**) desde zonas de la prolongación vítrea proximales al soma. G: célula con prolongación accesoria (**flecha abierta**). H: célula en contraste de fases, cuya inmunofluorescencia se muestra en I, y la **zona en recuadro** en J; esta célula indica que en E19 aún quedan células que están emitiendo prolongaciones de la cabellera vítrea desde zonas aplanadas (**flecha**) cercanas al soma; la **flecha** señala una prolongación que, *in situ*, va desde la MLE hasta la zona de la CPE. Aumentos: A, C, G, H, I: 650x; B, D, E, F, J: 1625x.

las prolongaciones que crecen en la porción distal de la prolongación vítrea.

También se observa marcaje con 3CB2 en la estructura en "T" de la porción distal de la prolongación ventricular de las células en fase 3 (no mostrado), así como en la prolongación accesoria que se observa en algunas células (figura 4.16, flecha abierta en G), la cual se origina en la prolongación ventricular.

La disgregación de retinas de E19 proporciona una mezcla de células en fase 3 avanzada y de células con formas adultas. El estudio de las formas en fase 3 en este estadio (figura 4.16 H-J) corrobora las observaciones en estadios anteriores. 3CB2 marca las prolongaciones en crecimiento que se originan en el polo vítreo del soma o en la porción proximal a él de la prolongación vítrea, así como el extremo ventricular, e incluso prolongaciones que parten de la MLE hacia la CPE (4.15, flecha fina en J). En este estadio el marcaje de 3CB2 se observa formando una trama de filamentos dispuestos longitudinalmente por toda la prolongación ventricular, el soma, las prolongaciones lameliformes de la porción proximal al soma de la prolongación vítrea, de las que se

originan prolongaciones de la cabellera (figura 4.16, cabeza de flecha en J), y en pequeños engrosamientos de las prolongaciones de la cabellera (no mostrado).

En las células adultas 3CB2 marca el soma (con excepción del núcleo) y todas las prolongaciones de la célula, incluidas las ramificaciones de la prolongación ventricular (figura 4.17), con la excepción de los *microvilli* del extremo ventricular de la célula.

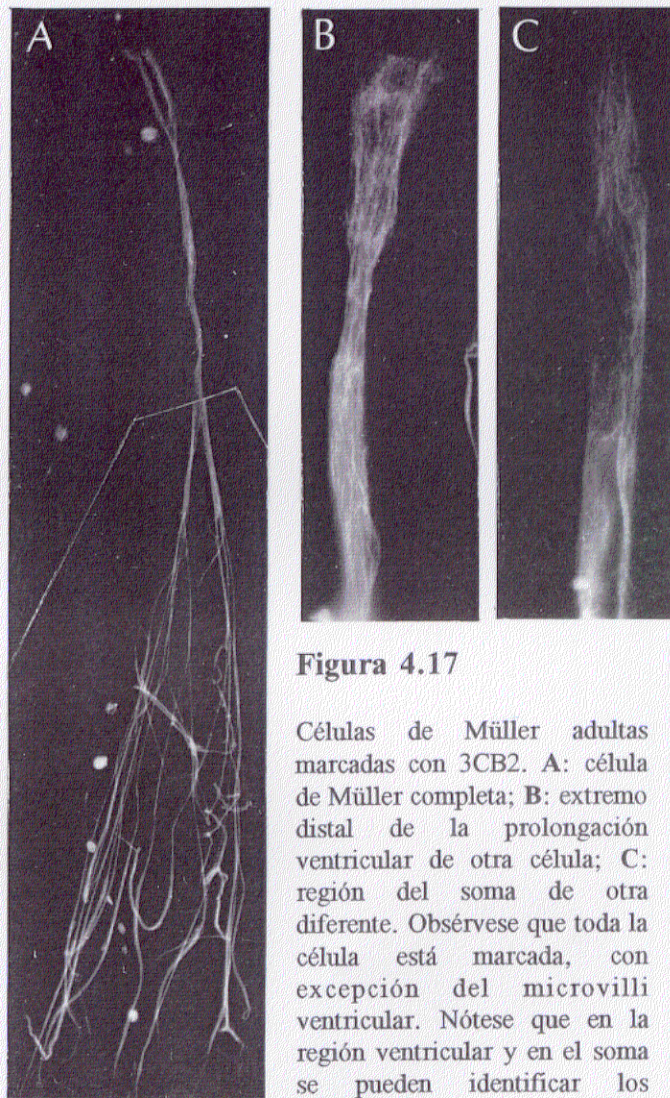


Figura 4.17

Células de Müller adultas marcadas con 3CB2. A: célula de Müller completa; B: extremo distal de la prolongación ventricular de otra célula; C: región del soma de otra diferente. Obsérvese que toda la célula está marcada, con excepción del microvilli ventricular. Nótese que en la región ventricular y en el soma se pueden identificar los filamentos. Aumentos: A: 650x; B y C: 1650x.

4.4.3 Expresión de α -tubulina y β -actina

La mayoría de preparaciones que hemos utilizado para el estudio de la expresión de α -tubulina y β -actina han sido dobles marcajes, pues nos interesaba la colocación de ambas moléculas.

En los primeros estadios, en E6 y E8, se observa un marcaje débil y generalizado en todo el neuroepitelio, que hace difícil identificar con certeza los glioblastos jóvenes. A partir de E10 ya se distinguen claramente células en fase 2 (figura 4.18), en las cuales el marcaje con anti α -tubulina presenta a la célula con un grosor menor que el marcaje con anti β -actina.

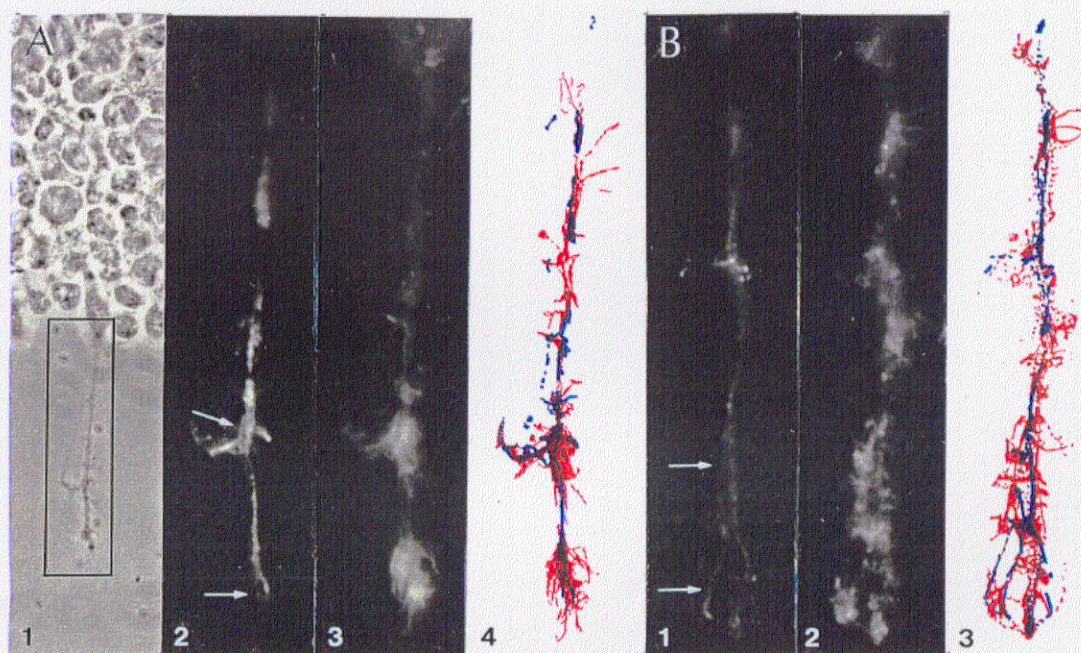


Figura 4.18

Células de Müller doblemente marcadas con anti α -tubulina y anti β -actina en E10 (A) y E12 (B). **A:** célula en E10 fotografiada por contraste de fases (1), marcada con anti α -tubulina (2) y anti β -actina (3), así como la imagen de la colocación de ambas moléculas (3) obtenida por superposición de ambos marcajes, en la cual el color azul representa la α -tubulina y el rojo la β -actina; **B:** célula de E12 marcada con anti α -tubulina (1) y anti- β -actina (2) y la colocación de ambas moléculas (3). Las flechas señalan haces longitudinales de α -tubulina en la parte distal de la prolongación vítrea. Aumentos: A1: 650x; todas las demás: 1625x.

La superposición de las imágenes obtenidas con ambos marcadores indica que la α -tubulina forma un esqueleto interno en las prolongaciones de la célula, mientras que la β -actina se distribuye por fuera de ese esqueleto. La figura 4.18 A muestra que la prolongación vítrea no está completamente marcada con α -tubulina, ya que algunas de las espículas que bordean esta prolongación no se marcan, y en las zonas en las que hay engrosamientos, sobre todo

en la parte más distal, la α -tubulina penetra en ellas formando haces longitudinales, pero no las rellena (figura 4.18, flechas). La β -actina, sin embargo, está en todas las espículas que podemos observar en contraste de fases y además revela algunas que por su pequeño grosor son difícilmente observables en contraste de fases. Ambas moléculas marcan con intensidad similar en estos estadios jóvenes.

El doble marcaje de células en fase 3 indica que la α -tubulina forma también una especie de esqueleto interno en algunas de las prolongaciones en fase de crecimiento que se originan en la porción proximal de la prolongación vítrea, mientras que la β -actina se distribuye por fuera de este esqueleto y distalmente (figura 4.19 A, B). La α -tubulina forma en estas prolongaciones haces longitudinales, al igual que hemos visto que ocurre en las prolongaciones que se originan de la porción distal de la prolongación vítrea (compárese la figura 4.19 A2 con la 4.18 B1). Esta molécula no se visualiza en las zonas lameliformes o velamentosas (figura 4.19, flechas en A y B) que hay entre las numerosas prolongaciones en crecimiento; sin embargo, la β -actina sí se encuentra en ellas. Ninguna de las dos moléculas se visualiza en la prolongación vítrea primitiva fuera de la zona proximal al soma (figura 4.19 B) ni en las prolongaciones definitivas de la cabellera vítrea (4.20 A). Sin embargo, ambas moléculas están distribuidas por la prolongación ventricular de las células en fase 3, aunque de manera diferente: mientras la α -tubulina rellena toda la prolongación ventricular con cierta intensidad, la β -actina sólo marca significativamente el extremo distal de esta prolongación (figura 4.19 C y 4.20).

En las células más diferenciadas de E19, y en adulto, ambas moléculas están distribuidas por la prolongación ventricular de las células en fase 3, pero mientras la α -tubulina rellena toda la prolongación ventricular como ocurría en E17, la β -actina sólo marca significativamente el *microvilli* del extremo distal de esta prolongación (figura 4.20, cabeza de flecha en B y C). La α -tubulina también se observa formando filamentos en torno al soma y en las prolongaciones vítreas más gruesas, entre el soma y el punto de emisión de la cabellera. La observación de la porción distal de la prolongación ventricular de células de animales adultos, por contraste de fases y marcadas con anti α -tubulina, indica que la ramificación observada en esta región de la célula por contraste de fases podría no ser tal, ya que la molécula aparece distribuida por los espacios que aparentemente se encuentran entre las prolongaciones. Esto nos indica que estas prolongaciones deben de estar comunicadas entre sí por laminaciones, al menos parcialmente, de modo que formarían un sistema de

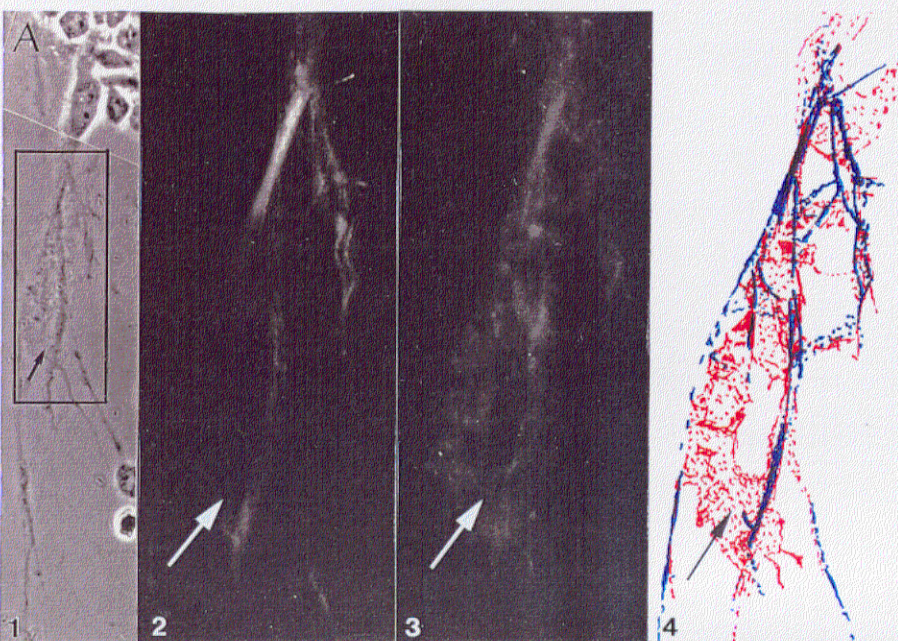


Figura 4.19

Células de Müller doblemente marcadas con anti α -tubulina y anti β -actina E17. Los marcajes en A y corresponden a las zonas en el recuadro en A1 y B1, es decir, la región de prolongación vítrea proximal al som. A: célula fotografiada por contraste de fases (1), marcada con anti α -tubulina (2) y anti β -actina (3), así como imagen de la colocación de ambas moléculas (4), obtenida por superposición de ambos marcajes, en la cual el color azul representa la tubulina y el rojo la β -actina; B: otro ejemplo con contraste de fases (1) marcado con anti α -tubulina (2), anti-actina (3) y colocación de ambas (4). En estas dos series, las flechas señalan zonas de aspecto velamento positivo para β -actina; C: extremo distal de una prolongación ventricular marcada con anti- α -tubulina (1) y anti- β -actina (2). Aumentos: A1: 650x; resto de figuras: 1625x.

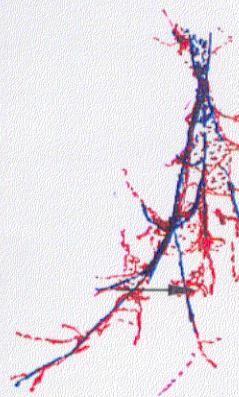
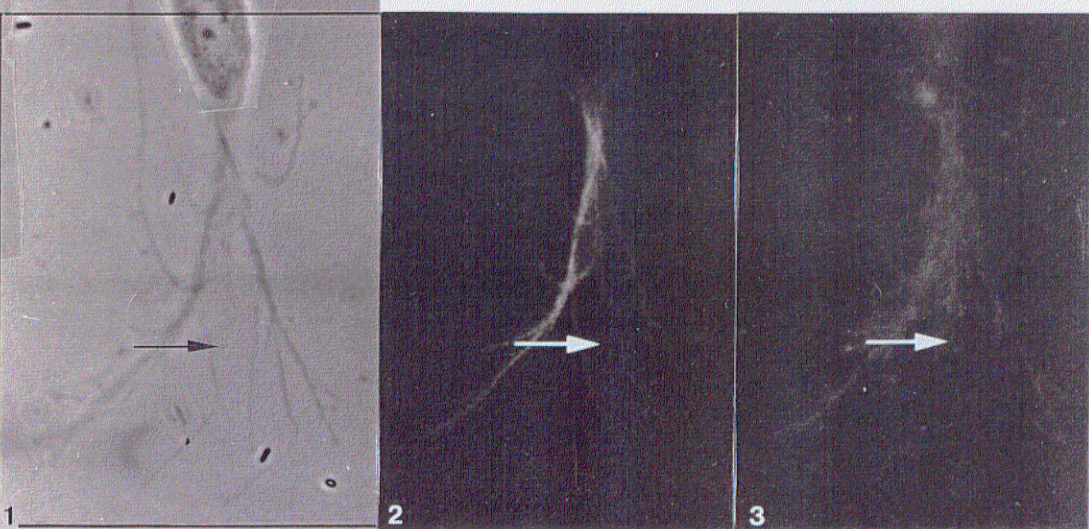
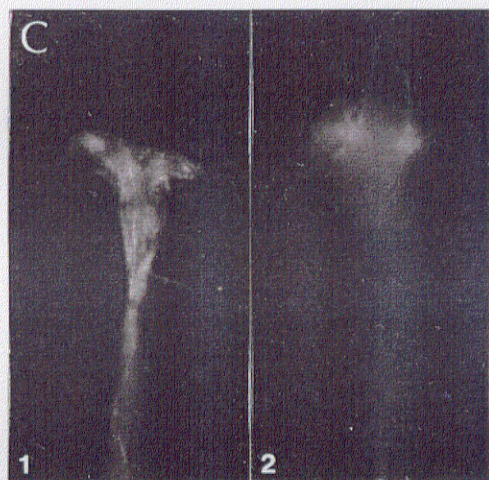
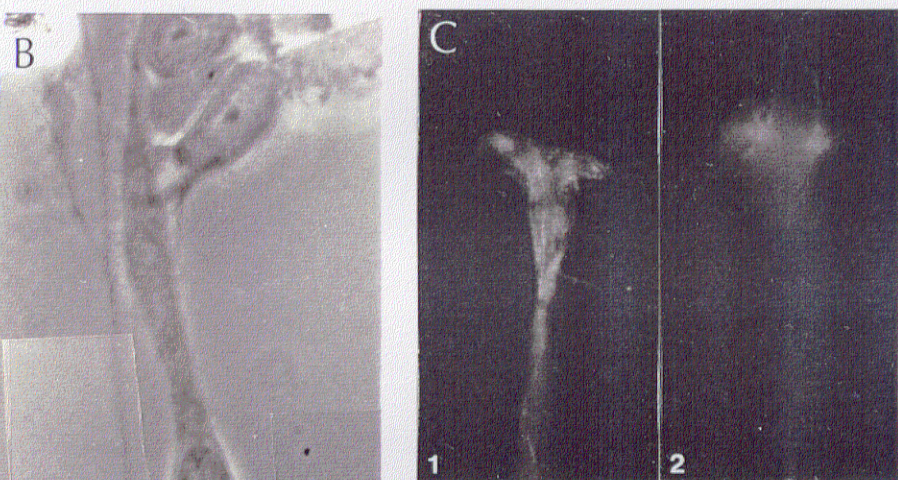
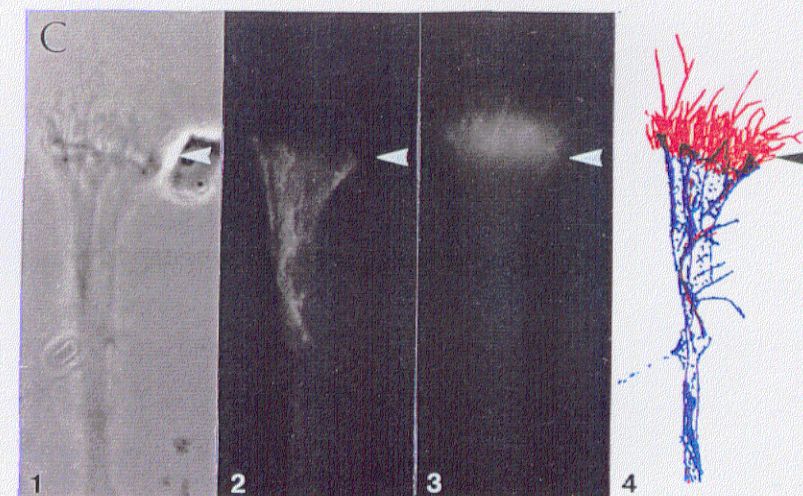
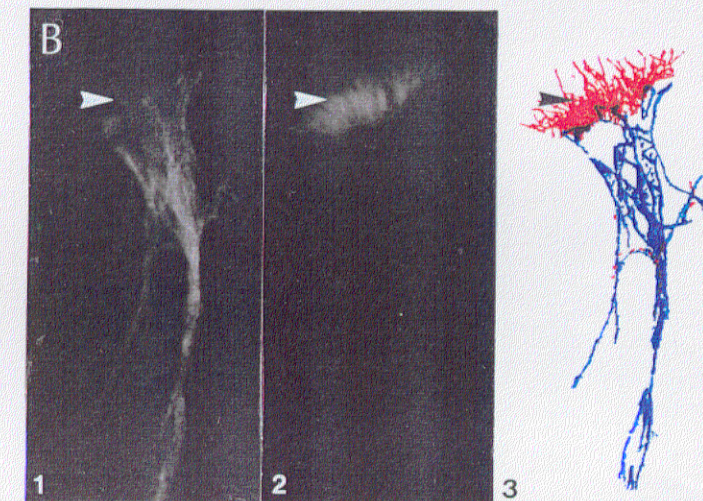
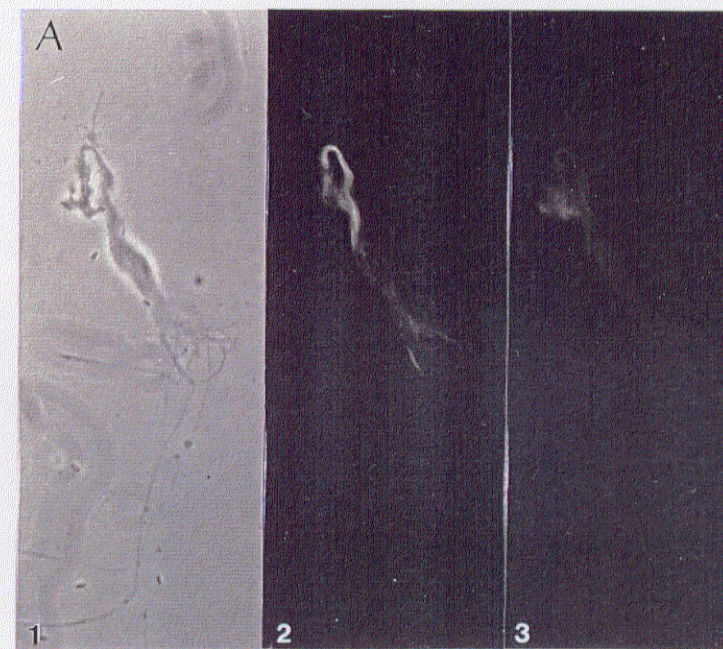


Figura 4.20

Ejemplos de células de Müller doblemente marcadas con anti α -tubulina y anti β -actina en E19 (A y B) y en animal adulto (C). A: célula de Müller de E19, aún en fase 3, vista por contraste de fases (1) y por inmunofluorescencia para α -tubulina (2) y β -actina (3); a estos pocos aumentos el marcaje es pobre, por la poca intensidad de la luz de excitación; B: extremo de la prolongación ventricular, ya diferenciada, de una célula en E19, marcada con anti- α -tubulina (1) y anti- β -actina (2), y su superposición (3); La flecha en 1 señala una prolongación muy fina que se orienta hacia la CPE; la cabeza de flecha señala la zona donde se sitúa el microvilli, que no se marca con anti- α -tubulina; C: otro ejemplo, de una célula adulta, mostrada por contraste de fases (1), marcada con anti- α -tubulina (2) y con anti- β -actina (3) y su superposición (4). Nótese que el contraste de fases revela el microvilli (cabeza de flecha), no marcado con anti- α -tubulina y sí con anti- β -actina; la aparente ramificación que se aprecia en el contraste de fases podría no ser tal, como indica 2. Aumentos: A: 650x; B y C: 1625x.



cavidades en la zona de la CNE.

4.4.4 Resumen

Hemos estudiado por inmunocitoquímica la expresión de tres moléculas de citoesqueleto, 3CB2, α -tubulina y β -actina, en la célula de Müller en diferenciación y adulta. La expresión de 3CB2 es muy intensa durante todo el período de diferenciación de la célula, ya desde su inicio en el estadio E8, y en el adulto. La expresión de α -tubulina y β -actina, sin embargo, es débil comparativamente a lo largo de todo el desarrollo. Estas moléculas se distribuyen por la célula de diferente manera. Durante todo el período de diferenciación de la célula 3CB2 la rellena por completo, incluyendo todas las prolongaciones en formación y sus conos de crecimiento. La α -tubulina forma en las fases 1 y 2 un esqueleto interno en todas las prolongaciones de la célula, excepto en las prolongaciones transitorias cortas y finas (*sprouting*) que surgen de la prolongación vítrea primitiva y en los conos de crecimiento. La β -actina, en cambio, está distribuida por fuera de la α -tubulina en toda la célula, incluyendo el *sprouting* y los conos de crecimiento. En la fase 3 de diferenciación la α -tubulina está distribuida por la prolongación ventricular, soma y porción proximal de las prolongaciones en crecimiento que surgen del polo vítreo del soma o de la porción proximal al soma de la prolongación vítrea primitiva. En cambio, no se encuentra en las porciones velamentosas de las que surgen también prolongaciones. Es notoria la mayor concentración de α -tubulina en la prolongación ventricular que en el resto de zonas por las que se distribuye. La β -actina presenta una expresión muy débil si comparamos con 3CB2 y α -tubulina. Se distribuye por las mismas zonas que α -tubulina, concentrándose más en la porción distal de la prolongación ventricular. Además, marca las porciones velamentosas de la región de la prolongación vítrea proximal al soma, así como la mayor parte de las prolongaciones en crecimiento que parten de esta zona. En adulto, la α -tubulina está en toda la prolongación ventricular, excepto el *microvilli*, así como en el soma y las prolongaciones más gruesas de la prolongación vítrea, mientras que la β -actina sólo está en el *microvilli* que surge del extremo distal de la prolongación ventricular.

5. DISCUSSION

5.1 METODO DE DISOCIACION CELULAR

Para el estudio de la morfogénesis de un tipo celular en concreto es muy importante el número de células que se puede estudiar, puesto que la morfogénesis es un proceso que se caracteriza por el cambio constante de la forma desde que las células abandonan el ciclo celular hasta que adquieren la forma adulta. Por ésto nos pareció que la puesta a punto de una técnica de disociación que fuese eficaz disgregando neuronas y glía del SNC embrionario y adulto, preservando las formas que presentan *in situ*, sería de gran utilidad para el estudio de los distintos tipos de células del Sistema Nervioso y su morfogénesis. El método que hemos desarrollado para disgregar eficazmente las células de Müller adultas y embrionarias es una variación del utilizado por Prada, C. y col. (1991) para disgregar células de la retina del pollo fácilmente reconocibles por su morfología, y permite la observación de mucho mayor número de células que los métodos hasta ahora utilizados para el estudio de la forma celular.

El aislamiento de células del Sistema Nervioso, sobre todo de neuronas, sin alteración de la morfología que presentan *in situ*, ha sido un objetivo permanente para los neurocientíficos. Sin embargo, los métodos convencionales de disociación, tanto mecánicos como químicos o enzimáticos, pueden ser muy traumáticos (Waymouth, 1974). Estos métodos han sido utilizados principalmente como fuente de células aisladas para su posterior cultivo. Las células embrionarias que se aíslan por los métodos convencionales son redondeadas y sin prolongaciones, aunque conservan, al menos parcialmente, la capacidad de dividirse, crecer y diferenciarse en la placa de cultivo (Freshney, 1987; Banker y Goslin, 1991). Estas células no sólo no son adecuadas para estudiar la morfogénesis, sino que han de ser identificadas una vez en cultivo por medios inmunocitoquímicos. Así, Murphy y Pearce (1987), explican que "*in vitro*, el término astrocito es sinónimo de una célula del Sistema Nervioso Central que se marca con anticuerpos contra la proteína fibrilar ácida glial". Otros métodos de disociación se usan para conseguir células susceptibles de ser registradas electrofisiológicamente (entre muchos otros: Kay y Wong, 1986; Kaneda y col., 1988; Turner y col., 1995; en retina: Lam, 1972; Bader y col., 1979; Tachibana, 1981).

Aunque la mayor parte de las técnicas de disociación publicadas están dirigidas al aislamiento de neuronas, también se han publicado diversos procedimientos para aislar células de glía (Booher y Sesenbrenner, 1972; McCarthy y De Vellis, 1980; Hatten, 1981; Meller, 1987; Baorto y col., 1992, entre muchos otros), y más concretamente células de Müller de

diversos vertebrados. Algunos de estos métodos se han utilizado para obtener células de Müller para su cultivo (Moscona, 1961; Burke y Foster, 1984; Li y Sheffield, 1984; Sarthy, 1985; Drazba y Lemmon, 1990; Hicks y Courtois, 1990), para registro electrofisiológico (Reichenbach y Birkenmeyer, 1984 en conejo; Newman, 1985a en salamandra; Malchow y col., 1989 en raya, entre los métodos más empleados), para estudios bioquímicos (Sarthy y Lam, 1978 en tortuga; Trachtenberg y Packey, 1983 en conejo; Poitry-Yamate y Tsacopoulos, 1992 en cobaya) y para estudios sobre su morfología y/o ultraestructura (Sarthy y Bunt, 1982 en tortuga; Reichenbach y Birkenmeyer, 1984 y Harstad y Ringvold, 1985 en conejo). Los métodos empleados para cultivo, en general utilizan como enzima lítica la tripsina y obtienen células con una mala preservación morfológica, aunque viables. La mayoría de los otros métodos citados usan la papaína, a veces en combinación con collagenasa y hialuronidasa, y son los que consiguen células con la mejor preservación morfológica, aunque el grado de preservación dista mucho del conseguido por nuestro método, a juzgar por los resultados y las ilustraciones de los artículos publicados. Harstad y Ringvold (1985) realizaron un estudio en el que compararon la preservación morfológica de células de Müller disgregadas de retina de conejo mediante tripsina y papaína. Concluyeron que la preservación es mejor usando papaína, tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica. Todos los métodos basados en la utilización de papaína para aislar células de Müller son modificaciones más o menos complejas del método establecido por Lam (1972) para aislar fotorreceptores de tortuga, o del de Bader y col. (1979), desarrollado para aislar fotorreceptores de salamandra. Uno de los métodos que hemos citado, el de Reichenbach y Birkenmeyer (1984), ha sido utilizado para estudiar la morfología adulta de las células de Müller (Reichenbach y col., 1985, 1988b, 1989; Reichenbach y Wohlrab, 1986; Reichenbach, 1987), su morfogénesis postnatal (Reichenbach y Reichelt, 1986) y determinados aspectos de la fisiología de su membrana (Reichenbach y col., 1985; Reichenbach y Eberhardt, 1986; Nilius y Reichenbach, 1988; Chao y col., 1993; Chao y col., 1994). Este grupo ha obtenido, a nuestro juicio, las células de Müller morfológicamente mejor preservadas de las que se encuentran en las ilustraciones de la literatura. Presentan, además, evidencias de que la ultraestructura de la célula también está bien preservada (Reichenbach y col., 1988b, 1990), aunque observan una ligera pérdida de forma en el pie de anclaje al vítreo. Es difícil comparar los resultados obtenidos con nuestro método en retina de pollo con los obtenidos por el método de Reichenbach y Birkenmeyer (1984) en retina de conejo, dado que se trata

de proteasas y especies distintas y que la morfología de la célula de Müller del pollo es mucho más compleja que la de conejo. Sin embargo, es un hecho objetivo que la variedad de formas embrionarias y adultas de células de Müller que hemos obtenido en este trabajo, así como la de otros tipos celulares de las retinas de pollo y rata obtenidas en otros trabajos realizados por mis colegas de laboratorio (Prada, C. y col., 1991; López-López, 1991; Morón, 1992) es muy superior a la obtenida por Reichenbach y Birkenmeyer (1984) y Reichenbach y Reichelt (1986) en retina de conejo. Además, tomando como referencia el *microvilli* (prolongaciones finísimas) que presenta la célula adulta en su extremo ventricular tanto en pollo (Prada, F. y col., 1989b) como en conejo (Reichenbach y col., 1989), éste sólo queda bien conservado en las células disgregadas por nuestro método. Sarthy y Lam (1978) y Sarthy y Bunt (1982) extrajeron, utilizando también papaína, células de Müller de la retina adulta de tortuga, las cuales son más complejas que las de mamíferos aunque menos que las de las aves (Ramón y Cajal, 1892). Nos es difícil nuevamente comparar la preservación de estas células con las obtenidas por nuestro método, ya que en esos trabajos se presenta una sola fotografía de microscopía óptica y otra de microscopía electrónica de barrido, respectivamente. No hay descritos métodos de disociación de retina de pollo que extraigan células de Müller embrionarias o adultas preservando su morfología, con las que poder comparar nuestros resultados. Los métodos actualmente usados para cultivos no liberan células morfológicamente reconocibles, y es tras el cultivo y la eliminación de las neuronas cuando se identifican las células de Müller por medio de marcadores (Li y Sheffield, 1984), ya que estas células cultivadas forman una monocapa de células aplanadas que en nada recuerdan por su morfología a las células de Müller. Por lo tanto, nuestro método es el primero que presenta utilidad para el estudio de la diferenciación, estructura y función de una de las células estructuralmente más complejas del SNC.

Dos ventajas importantes de nuestro método respecto a los publicados son la sencillez y la rapidez con la que se obtienen las células. No hay un método de disociación estándar sencillo que permita disociar las células del SNC, aunque la mayoría de los métodos incluyen los mismos procesos básicos, como la trituración mecánica del tejido y la incubación con proteasa y/o otras enzimas líticas, usadas en todo tipo de medios. Generalmente, el tejido pasa por medios diferentes antes de concluir la disociación y son muchas las variables, incluyendo la osmolaridad, el pH, el tiempo de incubación, la temperatura y quizás la presencia de nutrientes como la glucosa, que pueden modificar el resultado de la disociación

(Waymouth, 1974, 1982; Bashor, 1979; Kay y Wong, 1986; Freshney, 1987; Kaneda y col., 1988; Banker y Goslin, 1991). En el método de Reichenbach y Birkenmeyer (1984) para obtener la célula de Müller del conejo se emplean cuatro soluciones distintas (tabla 5.1). Una solución A se emplea para el aislamiento de la retina bajo luz roja. Después la retina se transfiere a una solución B, que contiene papaína. Esta solución se retira y se añade una solución C, en la cual se procede a realizar la disociación mecánica. Tras 5 minutos en los que se deja sedimentar el tejido, se guarda el sobrenadante y se repite el proceso de disociación para el tejido no disociado. Los dos últimos sobrenadantes son referidos por los

Tabla 5.1

Soluciones empleadas en el método de disociación descrito por Reicheichenbach y Birkenmeyer (1984).

Composición	Soluciones			
	A	B	C	D
Na ⁺ (mM/l)	150	150	150	150
K ⁺ (mM/l)	2	2	2	2
Ca ²⁺ (mM/l)	-	-	2	2
Mg ²⁺ (mM/l)	1	1	1	1
Cl ⁻ (mM/l)	126	126	132	132
SO ₄ ²⁻ (mM/l)	1	1	1	1
HCO ₃ ⁻ (mM/l)	-	-	24	24
H ₂ PO ₄ ⁻ (mM/l)	2.2	2.2	-	-
HPO ₄ ²⁻ (mM/l)	11.8	11.8	-	-
EDTA (mM/l)	-	1	-	-
Glucosa (mM/l)	34	34	8.3	8.3
BSA (%)	-	-	-	1...3
Plasma de caballo (%)	-	-	10	-
Papaína (mg/ml)	-	1	-	-

autores como los más ricos en células de Müller y por ésto se centrifugan en una solución D si se desea purificar las células de Müller. Se realizan en total 4 ciclos de disociación, lo cual, realizando una estimación optimista del tiempo empleado en la disociación, requiere al menos 4 horas y media desde que el tejido es extraído hasta que se obtienen las células

purificadas. Un procedimiento más rápido fue descrito por Trachtenberg y Packey (1983), el cual dura en torno a 150 minutos, según nuestros cálculos. En cambio, una extracción de células de Müller usando nuestro método no requiere más de 60 minutos desde que la retina es extraída, lo cual es una ventaja obvia. Además, aparte de la solución stock de proteasa, que se prepara en el momento, sólo empleamos soluciones de sacarosa al 6 ó al 10% en agua, muy sencillas de preparar y que se pueden conservar a 4°C durante bastante tiempo.

Una modificación interesante de los métodos de disociación del tejido nervioso que hemos comentado en este apartado es la desarrollada por Dreher y col. (1992), quienes disociaron con tripsina (1mg/ml) retinas de varias especies de mamíferos después de fijadas en PFA al 4%. La morfología de las células obtenidas es comparable a la que presentan las células recién disgregadas empleando papaína. Nuestro método no es compatible con la fijación previa. El inconveniente que tienen las células disgregadas tras la fijación es que no son útiles para estudios *in vivo*.

Nuestro método presenta diferencias notables respecto a los anteriormente utilizados para la disgregación del SNC. La concentración de proteasa que utilizamos (0.035-0.1 mg/ml) es mucho menor que la empleada en los otros métodos (0.3-2 mg/ml si se emplea papaína y 1.25-10mg/ml si se emplea tripsina; datos extraídos de la bibliografía citada), y varía según el estadio de desarrollo, el tipo de tejido, el tipo celular que se desea disgregar, y la especie. Sin embargo, Reichenbach y Birkenmeyer (1984) disocian células de retina de conejo desde P0 hasta adulto manteniendo la concentración de proteasa independientemente del estadio de desarrollo. Asumiendo que las proteasas actúan digiriendo moléculas de la matriz extracelular para liberar las células (Sarchy y Bunt, 1982), este cambio de concentración dependiente del estadio de desarrollo podría estar relacionado con cambios cuantitativos y/o cualitativos en la composición de la matriz. La baja concentración de proteasa SF utilizada en todos los estadios indica que es mucho más activa digiriendo las moléculas de la matriz extracelular que las otras proteasas.

La diferencia más llamativa entre nuestro método de disociación y los convencionales está en el medio de incubación. La proteasa SF sólo funciona en una solución de sacarosa 175-300 mM en agua destilada, o en tampón fosfato 1mM, o en Hepes 5 mM (resultados obtenidos en nuestro laboratorio). No funciona con ninguna de las soluciones salinas tamponadas utilizadas normalmente, lo que nos hace pensar que, o bien la fuerza iónica, o bien algún o algunos iones en particular, afectan negativamente al funcionamiento de la

proteasa SF. Mientras que las soluciones empleadas en otros métodos tienen una osmolalidad que ronda la del plasma, nosotros obtenemos las mejores disociaciones de células adultas con una osmolalidad de 175 mOsm/Kg. Además, el volumen de medio de disociación que empleamos es relativamente pequeño si lo comparamos con otros autores (empleamos de 300 a 800 μ l por retina, dependiendo de la edad). Este volumen varía también con el estadio de desarrollo, lo cual es distinto a lo que ocurre con otros métodos. A este respecto hay que señalar que Chad y col. (1991) también encuentran que la relación entre la masa del tejido y el volumen de disociación es importante a la hora de obtener una buena preservación morfológica de neuronas hipocámpales.

Células del SNC disociadas por nuestro método ya han sido utilizadas para estudios de desarrollo, empleando técnicas de autorradiografía (Prada, C. y col., 1991), inmunohistoquímica (Prada, F. y col., 1995) y citofotometría (López-López, 1991; Morón, 1992; López-Gallardo, 1995). Además, han sido cultivadas en nuestro laboratorio (López-Gallardo, resultados preliminares no publicados). La experimentación *in vivo*, seguida de la utilización de técnicas como las de electrofisiología, inyección intracelular de moléculas, o hibridación *in situ* aplicadas a células de Müller disgregadas y bien preservadas estructuralmente ofrece la posibilidad de nuevos abordajes para el estudio de la diferenciación y función de la célula de Müller.

5.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FORMAS CELULARES OBSERVADAS EN LOS DISGREGADOS Y EN PREPARACIONES DE GOLGI: MORFOGENESIS Y ESTRUCTURA ADULTA

Nuestro método de disgregación nos ha permitido conocer la variedad de formas de la porción ventricular de la célula de Müller adulta y distinguir tres fases en el proceso de morfogénesis de la célula, cuestiones ambas que no habían sido reveladas por las técnicas disponibles hasta ahora. Sin embargo, no hemos encontrado en nuestras células disgregadas las laminaciones que se observan con el método de Golgi en la parte de la prolongación vítrea que atraviesa la CNI. Esto puede ser debido a que en medio líquido estas estructuras laminares se colapsan o bien pierden su visibilidad. Ciertas discrepancias entre las formas de células de Müller adultas de conejo observadas *in situ* en preparaciones de Golgi y con microscopía electrónica y las observadas en células disgregadas, también han sido encontradas por Reichenbach y col. (1988b), quienes las explican por las restricciones espaciales que existen en el tejido intacto y no en el medio de disgregación. Las células disgregadas están en un medio líquido, sin impedimentos espaciales, por lo que sus prolongaciones pueden extenderse y observarse de manera diferente.

Una crítica a los estudios de las formas de las células en disgregaciones podría referirse a la posible pérdida de prolongaciones durante el proceso de disociación. Desde nuestro punto de vista la utilidad de las células disgregadas por nuestro método no radica en poder describir exactamente el número de prolongaciones de una célula determinada, sino en la información que hemos obtenido sobre los cambios globales de la forma de la célula de Müller y la distribución intracelular de moléculas. El gran número de células que se obtienen en el disgregado de una retina y la comparación de sus formas con las ya conocidas por otros métodos, nos permite distinguir qué células han perdido un número sustancial de prolongaciones, cuales no han perdido prolongaciones aparentemente y cuales son formas no descritas. Es obvio que algunas de las células disociadas que hemos utilizado en nuestro estudio pueden carecer de alguna prolongación, pero esto no es relevante para el estudio de la morfogénesis si la célula conserva la forma global conocida y tiene las características de una célula sana, es decir, no presenta signos de vacuolización o hinchamiento y posee un soma refringente (Cooper y Smith, 1992). El hecho de que en las células menos diferenciadas (fases 1-3) se conserven prolongaciones tan delicadas como son las que forman el *sprouting*,

o los filopodios y lamelipodios de los conos de crecimiento y las zonas de la célula con capacidad para emitir prolongaciones, y que en las células adultas se conserve el *microvilli*, son evidencias de que la proteasa SF actúa a través de la matriz extracelular sin hacer daño a las células. Pensamos que puede ser mayor el daño causado a las células por el proceso mecánico que por la digestión enzimática. Esta idea se basa en que al incrementar voluntariamente la ayuda mecánica en una disgregación realizada con un protocolo probadamente idóneo para obtener células intactas, el número de células deterioradas aumenta llamativamente.

El trabajo de Prada, F. y col. (1989b) en retina de pollo, realizado con el método de Golgi, describe y documenta que el proceso básico de diferenciación de la forma de la célula de Müller consiste en la formación secuencial de nuevas prolongaciones. Nuestro estudio corrobora estos resultados y además añade otros nuevos, que son desde nuestro punto de vista relevantes para avanzar en el entendimiento de cómo se diferencia esta célula. Hemos encontrado que en el inicio de su morfogénesis (E8) toda la superficie de la célula tiene capacidad de emitir prolongaciones transitorias pequeñas y numerosas (*sprouting*). Esta capacidad queda restringida secuencialmente a tres porciones de la célula, los extremos distal y proximal (al soma) de la prolongación vítrea y el extremo distal de la prolongación ventricular. Además hemos identificado tipos distintos de prolongaciones en base al momento y al modo en que se emiten. La célula emite primero las prolongaciones del extremo distal de la prolongación vítrea, en la CCG o en la CFNO. Después continúa formando la cabellera vítrea a base de prolongaciones que surgen en las proximidades del soma, en la CNI. En último lugar forma las prolongaciones del extremo distal de la prolongación ventricular, las cuales se extienden en la CNE. Es evidente que cada una de estas prolongaciones se emite en determinadas capas de la retina y no en otras. Por lo tanto, estos resultados indican que la restricción de la capacidad de emisión de prolongaciones definitivas podría deberse a la interacción de la célula de Müller con células (probablemente sólo con determinadas) de las diferentes capas de la retina. La interacción de las células de glía radial con el medio ambiente como determinante de la citotopografía de la célula adulta ha sido considerada por otros autores (Reichenbach, 1989; Reichenbach y col., 1989; Reichenbach y Robinson, 1995). Reichenbach (1989) clasifica las distintas formas de prolongaciones gliales en base al entorno celular en que se hallan y elabora una clasificación de los distintos tipos de células de glía en base al tipo de prolongaciones que presentan. Uno de los ejemplos citados por el

autor son las células endimogliales o relacionadas (las células de Müller entre ellas), que contactan con los espacios ventriculares o con espacios derivados de ellos, las cuales emiten *microvilli* hacia estos espacios en todas las especies de vertebrados estudiadas (Reichenbach y Robinson, 1995). Este punto de vista, que supone una fuerte influencia del ambiente sobre la diferenciación de las células de glía en general y sobre la célula de Müller en particular es razonable, pues resulta difícil por el momento aceptar que sólo el programa genético, sin interacción con el microambiente, es capaz de originar la diferenciación de la forma de la célula de Müller y la distribución de sus prolongaciones en estrecha relación con las capas de la retina que atraviesan. Además, no sólo las prolongaciones de la célula se distribuyen heterogéneamente en las distintas capas de la retina; también ocurre ésto con los orgánulos y con elementos del citoesqueleto (Meller y Glees, 1965; Rasmussen, 1972, 1974; Uga y Smelser, 1973a; Reichenbach y col., 1989a). En apoyo de este punto de vista está el hecho de que las células de Müller cultivadas sin interacción con otras células de la retina, forman una monocapa de células poligonales planas sin el menor parecido a las células de Müller *in situ* (Li y Sheffield, 1984) y que además expresan algunas características bioquímicas distintas de las que presentan *in situ*, quizás porque las neuronas en la retina intacta suprimen la expresión de algunas proteínas (Wolburg y col., 1990; Dabin y Barnstable, 1995). La interacción localizada de la célula de Müller con las células de su entorno durante el desarrollo, podría actuar reprimiendo la emisión de prolongaciones en determinadas zonas de la célula (nos referimos a las del *sprouting*) o induciendo la formación de prolongaciones en zonas concretas, lo que quizás podría ocurrir por conversión del *sprouting* en prolongaciones estables. Queda por determinar la naturaleza de las interacciones celulares que hacen que la célula de Müller emita sus prolongaciones siguiendo un patrón tan estereotipado, así como la contribución del programa genético específico de estas células. El avance en esta dirección nos parece importante no sólo para entender la morfogénesis de esta célula, sino para conocer procesos básicos de la Biología del Desarrollo del SNC. Sin embargo, la interacción celular no parece jugar el mismo papel en la diferenciación de todos los tipos de células de la retina. Así, los fotorreceptores siguen su desarrollo en cultivo, sin interacciones con otras células, de forma muy similar a como lo hacen *in situ* (Adler, 1987), lo cual sugiere que es principalmente el programa genético el que dirige la morfogénesis de los fotorreceptores.

La emisión de prolongaciones y los cambios de forma de células de glía se han estudiado sobre todo *in vitro*, en cultivos celulares de astrocitos. En cultivo, el microambiente

se puede modificar añadiendo o retirando del medio determinadas sustancias, así como variando el sustrato empleado y los tipos celulares que crecen en el cultivo. Cuando los astrocitos se ponen en cultivo en ausencia de neuronas, o a baja concentración de células sembradas, son células con apariencia epitelial, poligonales y extendidas; como hemos dicho a las células de Müller les ocurre lo mismo. Sin embargo, hay varios factores que hacen que los astrocitos emitan prolongaciones y adopten formas que recuerdan a las que presentan *in situ*. Uno de ellos es precisamente el contacto con neuronas (Hatten y Liem, 1981; Mason y col., 1988; Torres-Alemán y col., 1992). Este contacto promueve crecimiento de prolongaciones. Por otra parte, también se han descrito ejemplos de crecimiento de prolongaciones gliales en respuesta a cambios en la actividad neuronal *in situ*, como ocurre por ejemplo en el núcleo supraóptico de rata durante la lactancia (Salm y col., 1985), por deshidratación (Chapman y col., 1986) o por bloqueo reversible de la actividad aferente en el núcleo coclear del pollo (Canady y Rubel, 1992). Así pues, tanto *in vitro* como *in situ*, la presencia de neuronas y la actividad neuronal se ha visto que modifican la morfología de células gliales y las inducen a formar prolongaciones. Nuestro estudio es el primero en estudiar *in vivo/ex vivo* la emisión de prolongaciones de las células de Müller y ofrece nuevas perspectivas para diseñar experimentos *in vivo* y *ex vivo* encaminados a profundizar en el estudio de la interacción neurona-glía durante el desarrollo de la retina, a nivel celular y molecular.

El término "cono de crecimiento" se utiliza principalmente en referencia al cono de crecimiento axónico, una estructura que va en el ápice del axon y le hace crecer, así como "navegar", es decir, dirigirse a su diana. Algunos axones viajan a distancias considerables y es el cono el que guía al axon a través de microambientes que contienen señales atrayentes o repelentes para el cono (Kater y Rehder, 1995). Sin embargo, también se habla de conos de crecimiento de dendritas de neuronas en cultivo e *in situ* (Banker y Cowan, 1979), de conos de crecimiento de células neuroepiteliales en fase G₁ del ciclo (Hinds y Ruffet, 1971; Prada, C. y Ramírez, 1983) o de conos de crecimiento de las "prolongaciones guía" (*leading processes*) de neuroblastos en migración (Book y Morest, 1990). Por lo tanto, cono de crecimiento es cualquier estructura abultada situada en el ápice de una prolongación en crecimiento. También en el extremo de las prolongaciones de los astrocitos que experimentan un crecimiento neto en cultivo, se han encontrado ciertos engrosamientos denominados ápices de crecimiento que en cierto modo se parecen a los conos de crecimiento axonales (Mason

y col., 1988; Baorto y col., 1992), y que por lo dicho anteriormente son considerados conos de crecimiento gliales (Hatten, 1987). Nosotros describimos por vez primera en las células de Müller disgregadas prolongaciones que surgen de la porción distal de la prolongación vítrea y van rematadas por pequeños abultamientos o conos de crecimiento. Sin embargo, las prolongaciones vítreas que surgen de la porción proximal al soma no presentan abultamientos en sus extremos de crecimiento y, por tanto, podrían no crecer por mecanismos mediados por conos de crecimiento.

El crecimiento neto no es el único sistema por el que los astrocitos forman sus prolongaciones en cultivo. En ausencia de neuronas, determinados factores que aumentan la concentración de cAMP intracelular (proceso al parecer mediado por receptores β -adrenérgicos) inducen un fenómeno que se ha denominado "cavitación" (Pollenz y McCarthy, 1986; Shain y col., 1987, 1992; Goldman y Abramson, 1990). El borde de la célula se retrae hacia la zona central, dejando tras la retracción porciones de citoplasma más condensado y con un citoesqueleto más organizado, de modo que se establecen complejas prolongaciones, a veces comunicadas por zonas laminares, las cuales no superan el espacio que ocupaba la célula en reposo. Hay autores que sugieren que este proceso de cavitación es el primer paso, no imprescindible, antes del crecimiento neto de prolongaciones (Baorto y col., 1992). Este proceso es inhibido por glutamato (Shao y col., 1994) y endotelinas (Koyama y Baba, 1994), por lo que, si realmente ocurre *in situ*, puede también estar regulado por la actividad neuronal o por factores ambientales. Por último, se ha observado en estudios *in vivo* que prolongaciones de astrocitos sometidas a estiramiento pueden elongarse (Jaeger, 1988). Esto, que parece obvio, no lo es tanto, pues las prolongaciones podrían no ser capaces de elongarse en respuesta al estiramiento. El hecho de que se elonguen implica que existe una cierta plasticidad en la prolongación, y que hay síntesis y/o reordenamiento de moléculas del citoesqueleto y de la membrana plasmática en respuesta a ese estímulo. Estos resultados apoyan la posibilidad de que existan mecanismos de crecimiento en determinadas prolongaciones de las células de Müller diferentes a los conocidos mediados por conos de crecimiento.

La ramificación del extremo distal de la prolongación ventricular tampoco parece ocurrir por crecimiento mediante conos, y podría no haber crecimiento neto de prolongaciones, dado que este extremo de la célula permanece fijo, siempre en la posición de la MLE. Así pues, no es posible que haya prolongaciones creciendo en contacto con la

zona diana. Nuestras observaciones en células embrionarias disgregadas revelan la existencia de una bifurcación que se hace más marcada a medida que progresa el desarrollo. Esta bifurcación podría surgir por un proceso similar al de cavitación antes mencionado para astrocitos en cultivo. La membrana se retraería en torno a elementos del citoesqueleto y se formarían las estructuras en "T" y en "Y" que hemos descrito en las disociaciones. Este fenómeno podría potenciarse por un proceso de elongación de la célula en esta zona, debido al aumento de grosor de la CNE por el crecimiento de los fotorreceptores dentro de esta capa (López-López, 1991). La parte de la célula de Müller comprendida en la CNE se vería sometida a un estiramiento, ya que tiene uniones con los fotorreceptores a nivel de la MLE. El estiramiento en esta zona nos parece más probablemente motivado por los fotorreceptores que por las células de Müller, que parecen más susceptibles de ser influidas por su entorno (Reichenbach, 1989) que los fotorreceptores (Adler, 1987). Las observaciones en las que nos basamos para sugerir este posible mecanismo son puramente morfológicas, y no pretendemos sugerir que el mecanismo o las señales implicadas en la cavitación de astrocitos en cultivo y en la diferenciación de esta zona de la célula de Müller sean los mismos, pues no sabemos siquiera si la cavitación de los astrocitos ocurre *in situ*. Aunque se ha descrito aumento de la concentración intracelular de cAMP en células de Müller de pollo cultivadas expuestas a glucagón y péptido intestinal vasoactivo (Koh y col., 1984), no se ha relacionado con cambios de morfología. Lo que sí parece probable es que, cualquiera que sea el mecanismo implicado, los fotorreceptores jueguen un papel destacado, dado que las prolongaciones y laminaciones de las Müller rodean, al menos parcialmente, los somas de estas células (Meller y Glees, 1965). Un proceso de bifurcación de prolongaciones sin mediar conos de crecimiento ha sido también descrito por López-Gallardo (1995) en un estudio del desarrollo de la dendrita apical de las células piramidales del hipocampo *in situ*. En este caso, el punto de bifurcación de dicha dendrita se aproxima al soma a medida que progresa el desarrollo y no se han observado conos de crecimiento que puedan explicar el proceso de bifurcación.

Las finas prolongaciones que crecen desde el extremo de la prolongación ventricular y aparentemente se orientan hacia la CPE son posiblemente las descritas por Meller y Glees (1965), las cuales rodean los contactos sinápticos entre los fotorreceptores y las células bipolares. No hemos podido seguir en detalle el desarrollo de estas prolongaciones, pues son extremadamente finas, lo que dificulta su observación. Es evidente que estas prolongaciones experimentan un proceso de crecimiento neto sobre el cual no podemos decir si está mediado

o no por conos de crecimiento. La presencia en las células disgregadas de estas prolongaciones tan sumamente finas nos da confianza sobre la falta de agresividad de nuestro método de disociación.

El fenómeno de emisión de *sprouting* generalizado, hasta donde nosotros sabemos, no ha sido previamente descrito para las células de Müller. Nuestros resultados muestran que la emisión de prolongaciones transitorias sólo ocurre durante una etapa del desarrollo (E8-E13, aproximadamente) y presenta un patrón espacial en la célula que varía con el estadio del desarrollo. Aparece por toda la célula en los estadios más jóvenes y, a partir de E12, se restringe a zonas concretas de la célula en las cuales surgen prolongaciones estables. Dado que el *sprouting* no ha sido observado por el método de Golgi, cabría la posibilidad de que se tratase de un resultado artefactual del método de disociación. Sin embargo, el patrón espacio-temporal que manifiesta no es compatible con esta posibilidad. Tampoco es compatible con la posibilidad de que el *sprouting* sea emitido por la célula en el medio de disociación, inducido por algún factor presente en éste. En el caso de que se tratara de un fenómeno provocado por el proceso de disgregación, implicaría una distinta susceptibilidad a la emisión de *sprouting* según el estadio y la porción de la célula, lo que tendría en cualquier caso un significado biológico. Por otra parte, es ya conocido que otras células de la retina, como las ganglionares desplazadas (Prada, C. y col., 1992), las amacrinas colinérgicas (Génis-Gálvez y col., 1977; López-Gallardo y col., 1995) y los fotorreceptores (López-Lopez, 1991), emiten *sprouting* en estadios iniciales de su diferenciación. En las ganglionares desplazadas la aparición de *sprouting* a nivel de la CPI es, de hecho, el criterio utilizado para la identificación temprana de estas células. En neuronas cultivadas la emisión de múltiples prolongaciones transitorias es un fenómeno general previo a la emisión de prolongaciones definitivas, principalmente el axon (Dotti y col., 1988). También hay emisión de espículas en la superficie de los astrocitos en estadios previos a la emisión de prolongaciones inducidas por contacto con neuronas (Mason y col., 1988). Se ha descrito también la emisión de *sprouting* en astrocitos cultivados y expuestos a glutamato en ausencia de contacto con neuronas y en astrocitos que están en contacto con conos de crecimiento axonal (Cornell-Bell y col., 1990). Es evidente, pues, que nos encontramos ante un fenómeno común a múltiples tipos de células del SNC, previo a la emisión de prolongaciones definitivas. ¿Qué puede motivar la emisión de este *sprouting* en el caso de la célula de Müller? Cualquier hipótesis que formulemos no deja de ser una conjetura, pero podemos apuntar alguna

posibilidad. Una de ellas sería que ciertas señales extracelulares o el programa interno de la célula podrían inducir la formación generalizada de prolongaciones transitorias, de las cuales se establecerían como definitivas sólo aquellas que, por algún motivo, fuesen favorecidas. Dado que la emisión focalizada de *sprouting* ocurre en la zona de la prolongación vítrea más cercana al soma y en determinadas prolongaciones de la cabellera en formación, las más cortas, y que estas zonas se encuentran dentro de la CNI, podemos especular con que algún componente de esta capa podría ser el inductor de ese proceso, bien por contacto directo o por medio de señales extracelulares.

Las prolongaciones que hemos observado en las células de Müller adultas a nivel de la CNE y que constituyen las aparentes ramificaciones del extremo distal de la prolongación ventricular, son similares a las que aparecen en células disgregadas de conejo (Reichenbach y Reichelt, 1986), especie en la que se ha descrito que los somas de los fotorreceptores están totalmente recubiertos de expansiones laminares de las células de Müller, tanto en preparaciones de Golgi (Reichenbach y col., 1989, véase la figura 1.8) como inmunohistoquímicas (Robinson y Dreher, 1990, figura 1.9). Esta parece ser una característica común a todas las especies de mamíferos estudiadas (Dreher y col., 1992, figura 1.10; Reichenbach y Robinson, 1995). Sin embargo, en pollo estas expansiones laminares no aparecen claramente definidas en tinciones de Golgi (Ramón y Cajal, 1892, figura 1.5; Prada, F. y col., 1989b, figura 1.11). En cambio, en estudios ultraestructurales sí se ha observado que los somas de los fotorreceptores están bordeados por expansiones de las células de Müller (Meller y Glees, 1965). El estudio de la disposición espacial de las aparentes ramificaciones del extremo ventricular de la célula descritas en este trabajo requeriría la reconstrucción de cortes seriados ultrafinos.

Los trabajos de Ramón y Cajal (1892) y Prada, F. y col. (1989b) en pollo utilizando secciones impregnadas por el método de Golgi, muestran expansiones de la célula de Müller a nivel de la CNI que rodean parcialmente los somas de las neuronas situadas en esta capa. Meller y Glees (1965), en un estudio de microscopía electrónica corroboran este hecho, e indican que el recubrimiento es prácticamente total, debido al solapamiento de estas expansiones entre células de Müller vecinas. Este aislamiento de las neuronas de la CNI se ha observado en todas las especies estudiadas ultraestructuralmente (Reichenbach y Robinson, 1995; Reichenbach y col., 1995). En nuestras células disgregadas no hemos observado estas expansiones, como tampoco se han observado en células de Müller disociadas de otras

especies (Sarthy y Lam, 1978; Sarthy y Bunt, 1982; Reichenbach y col., 1988b), lo cual podría deberse a que o bien se retraen, o bien adquieren otra disposición espacial que hace imposible su observación.

En nuestro estudio no hemos encontrado las células de Müller tipo II descritas por Prada, F. y col. (1989b), sino que hemos encontrado variaciones de la forma básica de la célula tipo I descrita por estos autores, que es también el tipo descrito por Ramón y Cajal (1892). Una posibilidad es que no hayamos encontrado las células tipo II por ser menos abundantes y además localizarse en mayor proporción en la retina periférica, de la cual nosotros desechamos buena parte. Otra posibilidad es que en estas células las prolongaciones de la cabellera se agrupen o fasciculen de modo que den en preparaciones de Golgi la impresión de poseer menos prolongaciones de las que en realidad poseen. Por último, dado que las ilustraciones que estos autores presentan son de E19, y que indican que este tipo es más frecuente en retina periférica, las formas tipo II podrían corresponder a células en la fase 3 de diferenciación, con morfología global similar a la del adulto, pero que todavía carecen de alguna de las prolongaciones de la cabellera.

5.3 ESTUDIO DE LA SUPERFICIE DE MEMBRANA DE LAS CELULAS DE MULLER

Los métodos usados corrientemente para calcular superficie celular se distinguen en base a la utilización de técnicas electrofisiológicas o geométricas. Las técnicas electrofisiológicas consisten en hallar, bajo condiciones de fijación de voltaje, la capacidad eléctrica total de la membrana de la célula en estudio. Dado que la capacidad específica de las membranas biológicas es bastante constante (alrededor de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$), a partir de este dato se puede calcular la superficie de la célula. La precisión de la medida depende fundamentalmente del tamaño y la geometría de la célula. Cuanto mayor y más irregular sea ésta, menor será la superficie de membrana sometida a la fijación de voltaje, que es precisamente la que estamos midiendo. Dada la compleja morfología de la célula de Müller, esta técnica no es adecuada para medir su superficie.

Las técnicas geométricas usadas para medir superficie de células de Müller se diferencian en base a la utilización de microscopía electrónica u óptica. La medición de áreas mediante microscopía electrónica (expuesto por Rasmussen, 1972, 1973, 1975) resulta compleja debido a la complejidad de las células de Müller. Se realiza utilizando microfotografías en las que se identifican todos los perfiles de las células en estudio y se determina la **densidad de superficie**, es decir, la superficie de membrana de la población de células por unidad de volumen de tejido. Si se conoce qué cantidad de superficie de membrana de células de Müller hay por unidad de volumen de retina, y se conoce también el número de células que hay en el mismo volumen (se puede determinar contando los núcleos), se puede averiguar la superficie media de membrana de una célula, simplemente dividiendo la superficie total obtenida en las microfotografías entre el número de células. El uso este método requiere medir siempre en la misma zona de la retina, puesto que la longitud y la forma de las células de Müller varía según su localización en retina central o periférica. Por otra parte, como la célula de Müller atraviesa todas las capas de la retina, hay que hallar el valor de la densidad de superficie en todas las capas de la retina. Conociendo el grosor que ocupa cada capa dentro de la retina, podemos averiguar la densidad de superficie de la célula en todas las capas de la retina consideradas en conjunto. Los resultados obtenidos por este método son fiables siempre que se cumplan los requisitos expuestos, aunque el efecto del fijador empleado es difícilmente cuantificable y puede afectar de distinta forma a diferentes

partes de la célula.

Utilizando microscopía óptica y por un método similar al empleado por nosotros, Newman (1985a) midió el área de células de Müller disgregadas de retina de salamandra considerándolas formadas por fragmentos cilíndricos. Para ello dibujó a mano, de la pantalla de un monitor de vídeo, células individuales vivas en su medio de disociación. Dividió cada célula en fragmentos cilíndricos de $3.5\ \mu\text{m}$ de longitud y sumó las áreas laterales de cada uno de estos fragmentos, junto con el área de los dos extremos de la célula. Este tipo de aproximación es tanto más exacta cuanto menores son los segmentos cilíndricos considerados. Dada la morfología de las células, este método debe proporcionar valores muy aproximados a los reales para la prolongación vítrea, pero pensamos que infraestima la superficie del soma y del pie de anclaje vítreo, los cuales tienen una contribución alta a la superficie celular total.

Nosotros hemos modelizado la célula de Müller como un cuerpo geométrico formado por cilindros y por troncos de cono, un modelo que desde nuestro punto de vista se ajusta más a la realidad. Para simplificar los cálculos hemos desarrollado una fórmula que nos proporciona el área de este tipo de cuerpos. Aun cuando nuestro método podría ajustarse bastante a la realidad, debido a la complejidad de la forma de la célula de Müller y a las limitaciones inherentes a la propia metodología, los valores absolutos del área de la célula que hemos obtenido son una aproximación, pero que resulta útil para conocer el incremento en superficie de membrana que tiene lugar en las distintas fases de diferenciación morfológica de la célula.

El tamaño de determinadas prolongaciones de la célula son un factor limitante para la aplicación del método usado. Por esto, no hemos podido calcular la superficie de los *microvilli* que presenta la célula adulta, pues su grosor está en el límite del poder de resolución del microscopio óptico, y ni siquiera se puede contar su número. Igualmente, algunas de las espículas y prolongaciones transitorias que presentan las células en desarrollo son demasiado finas para poder ser medidas con precisión. Por esto, hemos comenzado a medir la superficie a partir de E13, estadio en el que el *sprouting* que presenta la célula tiene un tamaño medible. Por otra parte, como ya hemos señalado anteriormente, no podemos descartar que la célula pierda alguna de sus prolongaciones durante el proceso de disociación. El área de las células de Müller de conejo medida por microscopía electrónica de células *in situ* (Reichenbach y col., 1988b) es un 13 % mayor que la de las mismas células disgregadas y medidas con una combinación de microscopía electrónica y óptica (Reichenbach y col.,

1988a), quizá porque estas últimas pierdan prolongaciones. Para intentar minimizar este factor, sólo medimos células sin ningún signo aparente de deterioro. Además, tanto las células embrionarias (trabajo de Tesina) como las adultas (Prada, F. y col., 1989b) presentan en las preparaciones de Golgi porciones aparentemente velamentosas que no aparecen en las disgregadas, bien porque se pierden, o bien porque no son visualizables. Todos estos factores conducen a una estimación a la baja de la superficie celular.

En nuestra modelización hemos asumido que las células quedan adheridas al porta sin perder su forma. Sin embargo, las células se adhieren a éste en grado variable, lo que puede inducir un cierto grado de deformación en las células. Así, si la adhesión es excesiva, las medidas de grosor que tomemos serán mayores de lo que son en la realidad. El caso extremo se daría si las células quedaran totalmente aplastadas contra el porta, en cuyo caso el grosor que mediríamos para una prolongación sería 1,57 veces ($\pi/2$) su valor real, ya que lo que tomaríamos como diámetro sería en realidad la mitad de la longitud de la circunferencia que rodea a dicha prolongación. En nuestras preparaciones las células no están exageradamente adheridas, ya que a grandes aumentos se distinguen claramente varios planos de foco en ellas. Por tanto, el factor de error debido al grado variable de adhesión es menor de 1.57.

La modelización que hemos realizado se ha desarrollado para cuerpos geométricos de simetría bilateral. Este requisito no es completamente cumplido por las células de Müller, ni siquiera *in situ*, ya que algunas porciones de las prolongaciones de las células presentan un curso tortuoso en preparaciones de Golgi. Además, en el proceso de disgregación y extensión sobre portas las células sufren tensiones que hacen que se flexionen las prolongaciones y se pierda el eje de simetría, observándose que la longitud lateral no es la misma en ambos lados de la célula. Esto lo hemos compensado tomando como longitud lateral la mitad del perímetro, con lo que estamos promediando las longitudes laterales de ambos lados de la célula. El efecto esperado de la flexión es una disminución en la longitud observada, lo que se determinaría una disminución del área calculada con respecto al área real. Aunque no podemos cuantificar este efecto, que dependerá de las propiedades físicas de la célula y su membrana, como la flexibilidad, podemos apreciar intuitivamente que este efecto será tanto menor cuanto menor sea el grosor de las prolongaciones. Como son precisamente las prolongaciones más delgadas las que más se flexionan, podemos asumir que el efecto debe ser pequeño. Este problema también se plantea en el antes mencionado estudio de Newman (1985a), quien asume la simetría bilateral de las células como una exigencia del modelo, sin

plantear esta cuestión en la discusión.

Si bien la complejidad morfológica de la célula de Müller del pollo hace particularmente difícil abordar el estudio de su superficie de membrana, nuestro abordaje constituye el primer desafío a esta complejidad. Hemos hecho una modelización meticulosa de cada célula y hemos obtenido unas medidas que, considerando la existencia de factores que contribuyen de manera opuesta (sobreestimación e infraestimación) al error en la medida, pensamos que podrían ser bastantes próximas a las reales.

Al no haber en la literatura medidas de superficie de la célula de Müller del pollo, no podemos comparar con otros estudios. Sin embargo, podemos comparar nuestros resultados en células adultas con los obtenidos en otras especies de vertebrados, en relación a los cuales podemos especular. En la tabla D.2 resumimos los resultados obtenidos por los diferentes

Tabla D.2

Valores de la superficie de membrana de las células de Müller adultas en varias especies estudiadas.

ESPECIE	SUPERFICIE (μm^2)	AUTOR
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	2759	Rasmussen, 1973
Ardilla coreana (<i>Eutamias sciurus</i>)	2378	Rasmussen, 1975
Salamanquesa (<i>Gecko eublipharis macularis</i>)	20325	
Culebra de collar (<i>Natrix natrix</i>)	2038	
Salamandra (<i>Ambystoma tigrinum mavortium</i>)	5540	Newman, 1985a
Conejo, células <i>in situ</i>	10557 (región mielinizada) 7834 (región periférica)	Reichenbach y col, 1988b
Conejo, células disgregadas	6823 (región periférica)	Reichenbach y col, 1988a
Pollo (<i>Gallus domesticus</i>)	2948	Resultados de este trabajo

autores, en los que se observa que en casi todas las especies estudiadas la célula de Müller tiene entre 2000 y 7000 μm^2 de superficie, excepto en la salamanquesa, que tiene una superficie mucho mayor. Este valor tan alto puede entenderse si consideramos que la morfología de las células de Müller de reptiles puede ser tremendamente compleja (véase, en

la figura 1.7, la célula de Müller del camaleón). El valor que hemos obtenido para la superficie de las células de Müller de pollo estaría entre los valores medios, lo que confirma que el método de estimación puede ser adecuado. Al valor que hemos obtenido habría que añadirle la superficie del *microvilli*, que no hemos podido calcular. En el conejo el *microvilli* aporta una superficie de $220\text{-}360\mu\text{m}^2$ por célula (Reichenbach y col., 1988b). Añadiendo este valor a la superficie obtenida en pollo, tenemos $3168\text{-}3308\mu\text{m}^2$ para la célula de Müller en esta especie.

La superficie de membrana de una célula depende de su longitud, del grosor de sus prolongaciones y del grado de ramificación de las mismas. No tenemos ilustraciones de las células de Müller en las especies estudiadas por Rasmussen (1973, 1975), salvo en el caso de la rata, por lo que no podemos evaluar su complejidad morfológica sino indirectamente, a través de los datos de superficie de membrana que presentan. La célula de Müller de la salamandra (Newman, 1985a), pese a no estar ramificada, presenta una gran superficie de membrana, lo cual es atribuible al grosor de sus prolongaciones, como hemos comprobado gráficamente sobre una de las ilustraciones que presenta el autor. La célula de Müller del conejo, sin embargo, plantea un resultado sorprendente, pues hemos medido la superficie de alguna de las células de conejo disociadas por el grupo de Reichenbach y hemos obtenido una superficie de aproximadamente $1500\mu^2$, lo cual es bastante menor que los valores que presentan los autores ($6823\mu\text{m}^2$). Este valor es más cercano al esperable intuitivamente, por comparación de células de Müller digregadas de pollo y conejo fotografiadas a los mismos aumentos. Es posible que la disparidad entre sus resultados y nuestros cálculos sea debida al método de medida empleado, ya que estos autores miden la superficie de las células digregadas usando microscopía electrónica, un enfoque muy distinto al que empleamos nosotros. Al microscopio electrónico se contabilizan las zonas laminares que no se observan al microscopio óptico, obteniendo por nuestro método una estimación a la baja del área de las células. Queremos señalar, por último, que la superficie de membrana de la célula de Müller de rata, que fue calculada por microscopía electrónica *in situ* por Rasmussen (1973), es bastante menor que la de conejo, pese a tener una longitud mayor (observaciones propias) que la del conejo y tener una forma general muy similar a la de éste. De momento, no sabemos explicar estas discrepancias. El cálculo de la superficie de membrana de células de Müller de rata y de conejo con nuestro método podría proporcionar una explicación.

Las diferencias entre la superficie de membrana plasmática en unas especies y otras

han intentado ser explicadas por las diferencias de vascularización de la retina en las distintas especies estudiadas, así como por la distinta proporción de conos y bastones (Rasmussen, 1975), pero desde nuestro punto de vista, esta relación está aún lejos de ser demostrada.

Si bien los valores absolutos obtenidos en nuestro estudio podrían tomarse con cierta cautela, al no poder ser cotejados con otros estudios, no ocurre así con los resultados relativos al crecimiento en superficie a lo largo del desarrollo, ya que todas las células han sido sometidas al mismo proceso y están sujetas a los mismos errores de medida. Así pues, el crecimiento en superficie que observamos es real y los factores de incremento observados entre estadios podrían ser bastante aproximados a los que ocurren *in situ*. Que sepamos, ningún estudio ha cuantificado el aumento de la superficie de membrana de estas células a lo largo del desarrollo en ninguna especie. Lo más interesante, desde nuestro punto de vista, es la diferencia en el ritmo de crecimiento de la porción ventricular de la célula y de la vítrea, y el considerable incremento de superficie de membrana que experimenta la célula en su porción vítrea, el cual indica una polarización en el crecimiento de la célula que implica polarización del tráfico molecular intracelular. Los mecanismos que controlan la polarización de las células están empezando a investigarse. La célula de Müller se perfila como un buen modelo a investigar, para avanzar en este conocimiento.

5.4 EXPRESION DE MOLECULAS DE CITOESQUELETO

Es bien conocido que el citoesqueleto está formado, en las células no musculares, por tres sistemas de proteínas filamentosas: los microtúbulos, formados por dímeros de α - y β -tubulina, los microfilamentos, formados por monómeros de actina, y los filamentos intermedios, que pueden estar formados por monómeros de diferentes familias de proteínas. Cada uno de estos componentes del citoesqueleto une determinadas proteínas que se denominan "asociadas". La composición del citoesqueleto y la distribución de moléculas del mismo varía de célula a célula. Así, hay isotipos tanto de tubulina (Banerjee y Luduena, 1992) como de actina (Vanderkeckhove y Weber, 1978), los cuales se presentan en determinados tejidos y no en otros. Esto es aún más notable en los filamentos intermedios, los cuales se agrupan en 6 ó 7 familias, con varios componentes cada una, que también se localizan en determinados tejidos y no en otros (Hemmati-Brivanlou y col., 1992; Duprey y Paulin, 1995). La composición y estructuración del citoesqueleto también varía dentro de una misma célula. En las neuronas, por ejemplo, es muy distinta en el soma y en el axon (Braun y col., 1993). También varía a lo largo del desarrollo de una célula, como ocurre, por ejemplo, con la expresión de diferentes tipos de filamentos intermedios (Duprey y Paulin, 1995). La variabilidad del citoesqueleto no afecta solamente a los componentes principales, sino también a las proteínas asociadas, que igualmente se distribuyen de diferente manera según el tipo celular, la localización subcelular y el momento del desarrollo (una revisión interesante sobre proteínas asociadas a microtúbulos fue hecha por Bates y col., 1993, y sobre proteínas asociadas a microfilamentos por Way y Weeds, 1990).

La mayor parte de los estudios realizados *in vivo* sobre el citoesqueleto de las células de glía en general y de las células de Müller en particular, tratan sobre la expresión y distribución de determinados tipos de filamentos intermedios (véase el apartado 1.3.3.3 de la introducción). La utilización en los últimos años de anticuerpos monoclonales específicos contra filamentos intermedios o moléculas asociadas, los cuales marcan exclusivamente células de glía y no neuronas, han permitido conocer no sólo la expresión de estas moléculas en regiones diferentes del SNC, sino también la distribución de las células de glía en el mismo. Uno de nuestros objetivos era estudiar la expresión y distribución intracelular de tres moléculas del citoesqueleto en la célula de Müller a lo largo del desarrollo, prestando especial atención a su posible distribución en prolongaciones en proceso de crecimiento o en las zonas

donde se originan dichas prolongaciones, así como en los posibles conos de crecimiento. Hemos empleado un enfoque novedoso, consistente en utilizar células recién disgregadas, las cuales mantienen las formas que presentan *in situ* después de la disgregación y extensión en cubres. Con nuestro método hemos conseguido mantener la organización del citoesqueleto reduciendo al mínimo el tiempo transcurrido desde la disociación hasta que las células son fijadas. Podemos decir, por lo tanto, que se trata de un estudio *ex-vivo/in vivo*, puesto que tras la disociación no sustituimos el medio natural en el que están las células en el tejido por ningún medio de cultivo artificial. Queremos destacar que con nuestro método las células no se adhieren a la matriz extracelular que disponemos sobre el cubre por uniones como las que se establecen en cultivo, pues esto implicaría una reorganización del citoesqueleto, sino que se adhieren a sustratos adhesivos ayudadas por la centrifugación. Un enfoque parecido ha sido empleado por Weiler y Janssen-Bienhold (1993) para estudiar la distribución de actina en células horizontales de retina de carpa, aunque estos autores dejaron adherir las células a poli-L-lisina durante una hora. Hay algunos trabajos en los que se han aplicado técnicas de inmunocitoquímica a células de Müller disociadas, pero en ninguno se ha estudiado la distribución de actina ni de tubulina (Pfeiffer y col., 1994: glucógeno fosforilasa y vimentina en conejo; Biedermann y col., 1995: receptor D₂ para dopamina en rata; Grosche y col., 1995: glutamina sintetasa, GFAP y producto del oncogén Bcl-2 en conejo). El fijador que hemos empleado para marcar actina y tubulina contiene el detergente triton X-100, con lo que nos aseguramos de que la actina y la tubulina que se encuentran en forma soluble, sin formar parte de microtúbulos o microfilamentos, se lavan (Letourneau, 1983; Gordon-Weeks, 1993). De este modo, marcamos la actina y la tubulina que se encuentran polimerizadas, es decir, formando parte del citoesqueleto.

Hemos elegido el monoclonal MAS 077, del clon YL 1/2, para marcar tubulina, porque reconoce la subunidad α de la tubulina tirosinada. La α -tubulina se sintetiza con una tirosina en el extremo C-terminal. Esta tirosina se elimina poco después de que la α -tubulina se incorpore a un microtúbulo. Así, la forma tirosinizada es la que se ha sintetizado más recientemente, y se asume que los microtúbulos formados exclusiva o mayoritariamente por ella son los más recientemente polimerizados y los más inestables. Ahora bien, sabemos por otros trabajos que la forma tirosinizada se distribuye en mayor o menor medida por todos los microtúbulos (Baas y Black, 1990) y que su distribución coincide con la de la tubulina total. No ocurre así con anticuerpos que marcan la forma destirosinizada, pues se ha descrito que

esta última no marca, por ejemplo, la tubulina que se encuentra en los conos de crecimiento axónicos (Fan y col., 1993). Puesto que la distribución de α -tubulina y tubulina total coinciden, en esta discusión usaremos tubulina y α -tubulina indistintamente.

En la célula de Müller embrionaria el monoclonal MAS 077 marca un citoesqueleto de tubulina por toda la célula, menos en los conos de crecimiento. En la célula adulta marca solamente la prolongación ventricular, resultado éste que es acorde con lo descrito en conejo por Magalhães y Coimbra (1972) por microscopía electrónica; no marca las prolongaciones de la cabellera vítrea, ni los *microvilli*, en los que se sabe por estudios en otras células, como las del tracto digestivo, que no contienen citoesqueleto de tubulina (Alberts y col., 1992).

Para marcar la actina hemos usado el anticuerpo A 5441, del clon AC-15, el cual marca la isoforma β , de la cual se sabe que está presente en los conos de crecimiento axonales (Ulloa y Avila, 1996), y que esperábamos que se encontrara en los conos de crecimiento de las células de Müller. El marcaje intenso en los *microvilli* de la célula de Müller adulta, así como en las prolongaciones de las células pigmentarias y su peculiar distribución en los fotorreceptores, concordante con las observaciones de otros autores (Philp y Nachmias, 1985; Madreperla y Adler, 1989), indican que estamos marcando específicamente actina.

La célula de Müller del pollo contiene tres tipos de moléculas constituyentes de filamentos intermedios, vimentina, GFAP y desmina. Prada, F. y col., 1995 encontraron una molécula nueva del citoesqueleto de esta célula, reconocida por el anticuerpo monoclonal 3CB2, que podría ser un filamento intermedio o una proteína asociada. Estos autores descartan que sea cualquiera de los filamentos intermedios descritos en células de Müller. Nos interesó este monoclonal por ser un marcador muy específico de células de Müller y el que más temprano las marca en el tejido, y porque se había realizado con éxito la tinción de células disgregadas de estadios avanzados del desarrollo (Prada, F. y col., 1995). El hecho de que se trata de una molécula de citoesqueleto queda de nuevo confirmado por nuestros propios resultados, ya que mostramos claramente la tinción de filamentos discretos y redes de filamentos en las células disociadas.

Otro de nuestros objetivos era caracterizar molecularmente los conos de crecimiento de las células de Müller. Anteriormente hemos dicho que los conos de crecimiento mejor estudiados son los axonales, las estructuras por medio de las cuales crecen y navegan los axones. Estas estructuras presentan dos dominios; el central es rico en microtúbulos y

contiene orgánulos, el periférico o lamelar es rico en microfilamentos y carece de orgánulos. De la zona periférica se emiten abundantes espículas o filopodios que contienen también microfilamentos (Goldberg y Burmeister, 1989). Se han descrito diversos marcadores de conos de crecimiento axonales, quizás el más empleado la proteína GAP-43 (Skene y col., 1986), los cuales no han sido empleados en este trabajo, y que merecería la pena conocer si son constitutivos de los conos de crecimiento de las células de Müller. Uno de los ejemplos de cono de crecimiento axonal estudiado en la literatura es el de las células ganglionares de la retina. En nuestras preparaciones de células disgregadas y semidisgregadas hemos identificado estos conos de crecimiento en estadios en los que son especialmente abundantes (E6-E10), cuando las células ganglionares están en fase inicial de diferenciación y emiten su axon (Prada, C. y col., 1991). En ellos se observa que hay un núcleo marcado con anti-tubulina, distalmente al cual hay marcaje de β -actina. Estos conos también se marcan con el monoclonal 3CB2. Por otra parte, se acepta que el citoesqueleto de los conos de crecimiento axónicos es altamente inestable (Baas y Black, 1990; en general, todos los autores que trabajan con conos de crecimiento resaltan lo fácilmente que se desorganiza su citoesqueleto), y sin embargo con nuestro método de disgregación y preparación de las células no parece desorganizarse, al menos en los conos de las células ganglionares y de las células horizontales de la retina. Estos también han sido identificados y mantienen en las células disgregadas sus formas y la distribución de 3CB2 conocidas por estudios *in vivo*. Así pues, estos resultados también evidencian que el citoesqueleto no se desorganiza tras la disociación. La visualización de conos de crecimiento en células disgregadas del SNC es un hecho nuevo, interesante en sí mismo, puesto que permite su estudio sin necesidad de poner las células *in vitro*, situación en la que, como es bien sabido, las células varían la organización de su citoesqueleto en función del sustrato elegido para su cultivo.

Nuestros resultados indican que la expresión de los componentes del citoesqueleto varía a lo largo del desarrollo. Así, mientras la expresión de 3CB2 aumenta a medida que progresa el desarrollo, la expresión de α -tubulina y β -actina disminuye claramente y su distribución intracelular varía. Dado que las células han seguido el mismo procesamiento en todos los estadios de desarrollo estudiados, tenemos que descartar que el método de prepararlas sea la causa de las diferencias observadas en la intensidad del marcaje. Sin embargo, estos resultados han de ser analizados con cierta cautela, pues las diferencias en intensidad de marcaje pueden estar relacionadas con otros factores, como la exposición de los

epítomos que reconocen los anticuerpos, la estabilidad de los elementos del citoesqueleto en distintas zonas de la célula o la diferente concentración de las moléculas en partes concretas de la célula para realizar funciones localizadas. Asumiendo que los microtúbulos y microfilamentos no tienen por qué ser igualmente estables en todas las zonas de la célula, podría ocurrir, por ejemplo, que sólo detectásemos los que no se despolimerizan, es decir, los más resistentes a la disgregación y manipulación posterior de las células. Sin embargo, el grado de preservación de la forma de los conos de crecimiento axónicos de las células ganglionares y horizontales, y de los conos de crecimiento de las células de Müller, así como la distribución de las tres moléculas en ellos, junto con la distribución y estructuración de 3CB2, β -actina y tubulina en la célula de Müller adulta (y en otras células de la retina), nos hacen pensar que el patrón de marcaje que observamos se corresponde con la distribución real de las moléculas *in situ*. Baorto y col. (1992) han descrito que la formación de prolongaciones por los astrocitos en cultivo conlleva una redistribución de la actina, que desaparece en gran medida del soma celular y se concentra principalmente en las prolongaciones en crecimiento, donde podría jugar un papel similar al que juega en los conos de crecimiento axonales. Nuestros resultados, al mostrar marcaje diferencialmente intenso de β -actina y α -tubulina en las prolongaciones y zonas de crecimiento de la célula en desarrollo indican que estas moléculas también *in vivo* juegan un papel en la emisión de prolongaciones. A favor de esta interpretación están también los resultados de Goldman y Abramson (1990), quienes indican que las estructuras de actina que aparecen más patentes en astrocitos cultivados, las llamadas fibras de stress, desaparecen cuando comienza la emisión de prolongaciones. En estos estudios el marcador empleado para la actina es la faloidina, que se une a F-actina. El monoclonal que empleamos nosotros sólo se une a β -actina. Está en nuestro proyecto de futuro inmediato emplear faloidina en nuestras preparaciones, pues en las células de Müller podría haber también γ -actina, dado que es una de las formas encontradas por Flanagan y Lin (1979) en el SNC. Una vez que las prolongaciones definitivas se establecen, la cantidad de microfilamentos y microtúbulos distribuidos por toda la célula podría disminuir, quedando localizados en los lugares donde ejercen determinadas funciones.

La identidad de la molécula marcada por 3CB2 no está definitivamente aclarada, por lo que es difícil dar un significado biológico al aumento en intensidad de marcaje que observamos a lo largo del desarrollo. Prada, F. y col. (1995), indican que podría tratarse de una proteína asociada a filamentos intermedios (IFAP), ya que aunque su distribución es

distinta de la de los filamentos intermedios descritos hasta el momento, marca estructuras filamentosas y se expresa en muchas de las células en las que se ha descrito la presencia de vimentina. Sin embargo, no se puede descartar que se trate de un nuevo filamento intermedio o de una modificación post-transcripcional de la vimentina que tuviese un epítipo no reconocido por los anticuerpos disponibles actualmente contra vimentina. En principio no parece probable que se trate de un filamento intermedio, pues se acepta que éstos no están presentes en los conos de crecimiento; sin embargo, Hemmati-Brivanlou y col. (1992) han descrito un nuevo filamento intermedio, la tanabina, presente en determinados conos de crecimiento del SNC de *Xenopus laevis*; coincidentemente, 3CB2 marca intensamente (con mayor intensidad que los anticuerpos contra β -actina y α -tubulina) los conos de crecimiento axónico de células ganglionares y los conos de crecimiento de las células de Müller. Como hemos visto en los resultados, 3CB2 marca absolutamente toda la célula, excepto el *microvilli*, en células adultas. En las células fijadas con PFA, las usadas para testar 3CB2, no se observa por contraste de fases el *sprouting* generalizado que las células presentan *in vivo* o procesadas con otros fijadores. Es probable que el *sprouting* no se observe como consecuencia de la fijación con PFA, y que 3CB2 no esté en él. Cornell-Bell y col (1990) señalan que las espículas que forman el *sprouting* que emiten los astrocitos en cultivo expuestos a glutamato contienen actina, pero no filamentos intermedios ni microtúbulos.

En el ápice de la prolongación vítrea de determinadas células de Müller embrionarias hemos observado que la β -actina rodea un núcleo central de tubulina. Aquí podría la prolongación estar creciendo, dado que sabemos por las preparaciones de Golgi que, al menos hasta E11, aunque posiblemente también en estadios posteriores, existen células de Müller que no llegan a la limitante vítrea, pero que crecen hasta alcanzarla. En esta zona de crecimiento la β -actina siempre se sitúa externa y distalmente a la tubulina, como ocurre en los conos de crecimiento axónicos. También en la zona de emisión de la cabellera y en las prolongaciones en crecimiento se observa abundante marcaje de β -actina con el mismo patrón de distribución. Es interesante señalar que en los conos de crecimiento axónicos la actina parece implicada en la respuesta a señales y la tubulina en el crecimiento neto de la prolongación (Bentley y Toroion-Raymond, 1986; Forscher y Smith, 1988; Davenport y col., 1993), y que la actina se suele organizar en espículas, como ocurre en toda la prolongación vítrea de la célula de Müller al inicio de su diferenciación. En un sentido amplio, podríamos considerar toda la prolongación vítrea de la célula de Müller o porciones de la misma como

"regiones de crecimiento", es decir, zonas con la distribución de actina y tubulina propia de los conos de crecimiento, pero implicadas en la emisión de numerosas prolongaciones, no en el crecimiento de una prolongación preexistente.

En los conos de crecimiento de la parte distal de la prolongación vítrea de las células de Müller se observa un marcaje intenso de 3CB2, al igual que en todas las prolongaciones en crecimiento que formarán la cabellera vítrea. Así pues, es posible que la proteína reconocida por 3CB2 esté implicada en la emisión y/o el crecimiento de las prolongaciones de la célula de Müller. Tanto si se trata de un filamento intermedio como de una IFAP, esta observación es coincidente con la realizada por Mason y col. (1988) en células de glía de cerebelo cultivadas, quienes señalan que en los conos de crecimiento gliales hay acúmulo de filamentos intermedios, lo cual no se observa en los axonales. Por otra parte, Weinstein y col. (1991) han demostrado que un filamento intermedio (GFAP) es necesario para la emisión de prolongaciones de astrocitos cultivados en respuesta al contacto con neuronas.

Son muchos los estudios que se pueden realizar sobre el citoesqueleto de las células de Müller con la metodología que hemos puesto a punto, la cual ofrece el interés de combinar experimentos *in vivo* con la manipulación de las células *ex-vivo*. En este trabajo de Tesis Doctoral hemos estudiado la expresión y localización de 3CB2, β -actina y α -tubulina. Sin embargo, quedan muchas moléculas del citoesqueleto por estudiar, primero para conocer si las células de Müller las expresan *in situ*, y segundo para obtener información sobre su función *in vivo*. La célula de Müller del pollo, por su compleja arquitectura y la emisión de diferentes tipos de prolongaciones, se presenta como un excelente modelo para el estudio a nivel molecular de procesos morfogénéticos básicos.

6. CONCLUSIONES

1.- El método que hemos desarrollado para disociar células de Müller de retina de pollo, permite obtener un gran número de células con la morfología que presentan *in situ* y con su citoesqueleto preservados.

2.- La célula de Müller, durante su diferenciación morfológica, pasa por tres fases, caracterizadas por: 1) emisión de *sprouting* generalizado, 2) emisión de prolongaciones desde el extremo distal de la prolongación vítrea mediante conos de crecimiento, y 3) emisión de prolongaciones desde la porción proximal de la prolongación vítrea y formación de prolongaciones en el extremo distal de la prolongación ventricular, sin conos de crecimiento aparentes.

3.- La variedad de formas de ramificación de las prolongaciones primitivas ventricular y vítrea originan una variedad de formas adultas que eran desconocidas hasta ahora, y cuyo significado biológico queda por desvelar.

4.- La célula de Müller incrementa su superficie de membrana más de 10 veces desde E13 hasta el adulto. Aunque el área de la prolongación ventricular experimenta un incremento considerable (4 veces), el incremento que experimenta la prolongación vítrea es muy superior (30 veces), debido a la formación de las múltiples prolongaciones de la cabellera vítrea. Quedan por estudiar los mecanismos subyacentes a esta polarización del crecimiento de la célula hacia la porción vítrea de la misma.

5.- La proteína 3CB2 se expresa en todas las células neuroepiteliales hasta E8, estadio en el que su expresión queda restringida a las células de Müller hasta E14, momento a partir del cual se expresa también en células horizontales. 3CB2 marca toda la célula de Müller durante el período de diferenciación, incluyendo los conos de crecimiento y las prolongaciones en crecimiento, excepto el *sprouting* de las células en las fases 1 y 2. En el adulto 3CB2 rellena toda la célula con la excepción del *microvilli*.

6.- La distribución de α -tubulina y β -actina en la célula de Müller varía a lo largo del desarrollo y está claramente compartimentalizada en la célula adulta, sugiriendo que estas moléculas podrían servir a funciones diferentes a lo largo del desarrollo.

7.- En las fases 1 y 2 la α -tubulina forma un esqueleto interno en todas las prolongaciones de la célula y en los conos de crecimiento, y no se encuentra en el *sprouting* que surge de la prolongación vítrea. La β -actina se distribuye por fuera de la α -tubulina en toda la célula, incluyendo el *sprouting* y los conos de crecimiento. Esta distribución de ambas moléculas en las prolongaciones iniciales de la célula es muy probablemente característica de cualquier prolongación en crecimiento de las células del SNC, dado que una distribución semejante se encuentra también en las prolongaciones en crecimiento de neuronas y glía en cultivo.

8.- En la fase 3 de diferenciación la α -tubulina está distribuida por la prolongación ventricular, soma y porción proximal de las prolongaciones en crecimiento que formarán la cabellera vítrea. Esta distribución concuerda sólo en parte con la idea generalmente admitida de que los microtúbulos estabilizan las prolongaciones definitivas, al no encontrarse en las prolongaciones definitivas de la prolongación vítrea. La β -actina se distribuye por las mismas zonas que la α -tubulina, concentrándose más en la porción distal de la prolongación ventricular. Además, marca zonas velamentosas de la región de la prolongación vítrea proximal al soma, así como la mayor parte de las prolongaciones en crecimiento que parten de esta zona. Esta distribución sugiere un papel de la β -actina en la prolongación ventricular diferente al conocido en los conos de crecimiento.

9.- En adulto, la α -tubulina está en toda la prolongación ventricular, excepto el *microvilli*, así como en el soma y las porciones más gruesas de la prolongación vítrea, mientras que la β -actina sólo se encuentra en el *microvilli* que surge del extremo distal de la prolongación ventricular. Estos resultados muestran una compartimentalización de ambas moléculas y una distribución polarizada hacia la porción ventricular de la célula, cuyo significado funcional será sin duda el objetivo de investigaciones futuras.

7. BIBLIOGRAFIA

Abd-El-Basset, E.M.; Ahmed, I.; Kalnins, V.I. y Fedoroff, S. (1992). Immuno-electron microscopical localization of vimentin and glial fibrillary acidic protein in mouse astrocytes and their precursor cells in culture. *Glia* 6:149-153.

Adler, R. (1987). Nature and nurture in the differentiation of retinal photoreceptors and neurons. *Cell Differ.* 20:183-188.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.D. (1992). *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Amato, A.; Barbour, B.; Szatkowski, M. y Attwell, D. (1994). Counter-transport of potassium by the glutamate uptake carrier in glial cells isolated from the tiger salamander retina. *J. Physiol.* 479:371-380.

Anchan, R.M.; Reh, T.A.; Angello, J.; Balliet, A. y Walker, M. (1991). EGF and TGF- α stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation *in vitro*. *Neuron* 6:923-936.

Ashwell, K. (1989). Development of microglia in the albino rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 287:286-301.

Baas, P.W. y Black, M.M. (1990). Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability. *J. Cell Biol.* 111:495-509.

Bader, C.R.; MacLeish, P.R. y Schwartz, E.A. (1979). A voltage clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *J. Physiol. (Lond.)* 296:1-26.

Banerjee, A. y Luduena, R.F. (1992). Kinetics of colchicine binding to purified β -tubulin isotypes from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 267:13335-13339.

Banker, G.A. y Cowan, W.M. (1979). Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J. Comp. Neurol.* 187:469-494.

Banker, G.A. y Goslin, K. (Eds.). (1991). Primary dissociated cell cultures of neural tissue. In *Culturing nerve cells*. pp 41-51. MIT Press, Cambridge, Massachusetts, London, England.

Baorto, D.M.; Mellado, W. y Shelanski, M.L. (1992). Astrocyte process growth induction by actin breakdown. *J. Cell Biol.* 117:357-367.

Barbour, B.; Brew, H. y Attwell, D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 335:433-435.

Barbour, B.; Brew, H. y Attwell, D. (1991). Electrogenic uptake of glutamate and aspartate into glial cells isolated from the salamander (*Ambystoma*) retina. *J. Physiol.* 436:169-193.

Barnstable, C.J. (1980). Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina. *Nature* 286:231-235.

- Barnstable, C.J.; Hofstein, R. y Akagawa, K. (1985). A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Dev. Brain Res.* **20**:286-290.
- Bashor, M.M. (1979). Dispersion and disruption of tissues. In *Methods in enzymology* (W. B. Jakoby and I. H. Pastan eds.) Vol. LVIII, pp. 119-131. Academic Press, Inc. New York.
- Bates, C.A.; Trinh, N. y Meyer, R.L. (1993). Distribution of microtubule-associated proteins (MAPs) in adult and embryonic mouse retinal explants: Presence of the embryonic Map, MAP5/1B, in regenerating adult retinal axons. *Dev. Biol.* **155**:533-544.
- Bentley, D. y Toroion-Raymond, A. (1986). Disordered pathfinding by pioneer neurone growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment. *Nature (Lond.)* **323**:712-715.
- Berg, K. y Wolburg, H. (1989). Müller (glial) cells but not astrocytes in the retina of the goldfish possess orthogonal arrays of particles. *Glia* **2**:458-469.
- Berkow, J.W. y Patz, A. (1964). Developmental histochemistry of the rat eye. *Invest. Ophthalmol.* **3**:22-33.
- Berliner, M.L. (1931). Cytologic studies on the retina: I. Normal coexistence of oligodendroglia and myelinated nerve fibers. *Arch. Ophthalmol.* **6**:740-751.
- Bhattacharjee, J. y Sanyal, S. (1975). Developmental origin and early differentiation of retinal Müller cells in mice. *J. Anat.* **2**:367-372.
- Biedermann, B.; Fröhlich, E.; Grosche, J.; Wagner, H.J. y Reichenbach, A. (1995). Mammalian Müller (glial) cells express functional D₂ dopamine receptors. *Neuroreport* **6**:609-612.
- Bignami, A. (1984). Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. *Brain Res.* **300**:175-178.
- Bignami, A. y Dahl, D. (1979). The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp. Eye Res.* **28**:63-69.
- Bignami, A.; Raju, T. y Dahl, D. (1982). Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. *In vivo* and *in vitro* immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera. *Dev. Biol.* **91**:286-295.
- Björklund, H.; Bignami, A. y Dahl, D. (1985). Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Müller glia and retinal astrocytes. *Neurosci. Lett.* **54**:363-368.
- Bok, D.; Ong, D.E. y Chytil, F. (1984). Immunocytochemical localization of cellular retinol binding protein in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **25**:877-883.

- Booher, J. y Sensenbrenner, M. (1972). Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiol.* **2**:97-105.
- Book, K.J. y Morest, D.K. (1990). Migration of neuroblasts by perikaryal translocation: role of cellular elongation and axonal outgrowth in the acoustic nuclei of the chick embryo medulla. *J. Comp. Neurol.* **297**:55-76.
- Bouvier, M.; Szatkowski, M.; Amato, A. y Attwell, D. (1992). The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* **360**:471-474.
- Boya, J.; Calvo, J.; Carbonell, A.L. y García-Mauriño, E. (1986). Nature of macrophages in rat brain. *Acta anat.* **127**:142-145.
- Boya, J.; Carbonell, A.L.; Calvo, J. y Borregón, A. (1987). Ultrastructural study on the origin of rat microglia cells. *Acta anat.* **130**:329-335.
- Boya, J.; Carbonell, A.L.; Calvo, J. y Borregón, A. (1991). Microglial cells in the central nervous system of the rabbit and rat: cytochemical identification using different lectins. *Acta anat.* **140**:250-253.
- Brandon, C. y Lam, D.M.-K. (1983). L-glutamic acid: A neurotransmitter candidate for cone photoreceptors in human and rat retinas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:5117-5121.
- Braun, N.; Schikorski, Th. y Zimmermann, H. (1993). Cytoplasmic segregation and cytoskeletal organization in the electric catfish giant electromotoneuron with special reference to the axon hillock region. *Neurosci.* **52**:745-756.
- Brew, H. y Attwell, D. (1987). Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature* **327**:707-709.
- Brew, H.; Gray, P.T.A; Mobbs, P. y Attwell, D. (1986). Endfeet of retinal glial cells have higher densities of ion channels that mediate K⁺ buffering. *Nature* **324**:466-468.
- Bunt-Milam, A.H. y Saari, J.C. (1983). Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *J. Cell Biol.* **97**:703-712.
- Burke, J.M. y Foster, S.J. (1984). Culture of adult retinal glial cells: methods of cellular origin of explant outgrowth. *Curr. Eye Res.* **3**:1169-1178.
- Canady, K.S. y Rubel, E.W. (1992). Rapid and reversible astrocytic reaction to afferent activity blockade in chick cochlear nucleus. *J. Neurosci.* **12**:1001-1009.
- Casper, D.S.; Trelstad, R.L. y Reif-Lehrer, L. (1982). Glutamate-induced cellular damage in isolated chick embryo retina: Müller cell localization of initial effects. *J. Comp. Neurol.* **209**:79-90.

Chad, J.E.; Stanford, I.; Wheal, H.V.; Williamson, R. y Woodhall, G. (1991). Dissociated neurons from adult rat hippocampus. In *Cellular Neurobiology. A Practical Approach*. (Ed. Chad J. and Wheal H.) pp. 19-37. IRL Press at Oxford University Press.

Chan, C.-C.; Rozenszajn, L.A.; Nussenblatt, R.B.; Muellenberg-Coulombre, C.; Hsu, S.-M.; Palestine, A.G.; Lando, Z. y BenEzra, D. (1984). Monoclonal antibodies to Müller's cells of the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **25**:1007-1012.

Chao, T.I.; Panicke, T.; Reichelt, W. y Reichenbach, A. (1993). Na⁺ channels are expressed by mammalian retinal glial (Müller) cells. *Neuroreport* **4**: 575-578.

Chao, T.I.; Skachkov, S.N.; Eberhardt, W. y Reichenbach, A. (1994). Na⁺ channels of Müller (glial) cells isolated from retinæ of various mammalian species including man. *Glia* **10**:173-185.

Chapman, D.B.; Theodosis, D.T.; Montagnese, C.; Poulain, D.A. y Morris, J.F. (1986). Osmotic stimulation causes structural plasticity of neurone-glia relationships of the oxytocin but no vasopressin secreting neurones in the hypothalamic supraoptic nucleus. *Neurosci.* **17**: 679-686.

Cocchia, D.; Polak, J.M.; Terenghi, G.; Battaglia, F.; Stolfi, V.; Gangitano, C. y Michetti, F. (1983). Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina - 2. Electron Microscopical Immunocytochemistry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **24**:980-984.

Conner, J.D.; Detwiler, P.B. y Sarthy, P.V. (1985). Ionic and electrophysiological properties of retinal Müller (glial) cells of the turtle. *J. Physiol.* **362**:79-92

Cooper, M.W. y Smith, S.J. (1992). A real time analysis of growth cone-target cell interactions during the formation of stable contacts between hippocampal neurons in culture. *J. Neurobiol.* **23**:814-828.

Cornell-Bell, A.H.; Thomas, P.G. y Smith, S.J. (1990). The excitatory neurotransmitter glutamate causes filopodia formation in cultured hippocampal astrocytes. *Glia* **3**:322-334.

Dabin, I. y Barnstable, C.J. (1995). Rat retinal cells express Thy-1 following neuronal cell death. *Glia* **3**:23-32.

Dahl, D. y Bignami, O. (1982). Immunohistological localization of desmin, the muscle-type 100 A filament protein, in rat astrocytes and Müller glia. *J. Histochem. Cytochem.* **30**:207-213.

Davenport, R.W.; Dou, P.; Rehder, V. y Kater, S.B. (1993). A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature* **361**:721-723.

Distler, C.; Weigel, H. y Hoffmann, K.-P. (1993). Glia cells of the monkey retina. I. Astrocytes. *J. Comp. Neurol.* **333**:134-147.

- Dotti, C.G.; Sullivan, C.A. y Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **8**:1454-1466.
- Dräger, U.C. (1983). Coexistence of neurofilaments and vimentin in a neurone of adult mouse retina. *Nature* **303**:169-172.
- Dräger, U.C.; Edwards, D.L. y Barnstable, C.J. (1984). Antibodies against filamentous components in discrete cell types of the mouse retina. *J. Neurosci.* **4**:2025-2042.
- Drazba, J. y Lemon, V. (1990). The role of cell adhesion molecules in neurite outgrowth on Müller cells. *Dev. Biol.* **138**:82-93.
- Dreher, Z.; Robinson, S.R. y Distler, C. (1992). Müller cells in vascular and avascular retinae: a survey of seven mammals. *J. Comp. Neurol.* **323**:59-80.
- Duprey, P. y Paulin, D. (1995). What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **39**:443-457.
- Ehinger, B. (1973). Glial uptake of taurine in the rabbit retina. *Brain Res.* **60**:512-516.
- Ehinger, B. (1977). Glial and neuronal uptake of GABA, glutamic acid, glutamine and glutathione in the rabbit retina. *Exp. Eye Res.* **25**:221-234.
- Ehinger, B.; Zucker, C.L.; Bruun, A. y Adolph, A. (1994). *In vivo* staining of oligodendroglia in the rabbit retina. *Glia* **10**:40-48.
- Ehrlich, D. (1981). Regional specialization of the chick retina as revealed by the size and density of neurons in the ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.* **195**:643-657.
- Faff-Michalak, L.; Reichenbach, A.; Dettmer, D.; Kellner, K. y Albercht, J. (1994). K^+ -, hypoosmolarity-, and NH_4^+ -induced taurine release from cultured rabbit Müller cells: role of Na^+ and Cl^- ions and relation to cell volume changes. *Glia* **10**:114-120.
- Fan, J.; Mansfield, S.G.; Redmon, T.; Gordon-Weeks, P.R. y Raper, A. (1993). The organization of F-Actin and microtubules in growth cones exposed to a brain derived collapsing factor. *J. Cell Biol.* **121**:867-878.
- Fernández, E.; Cuenca, N.; García, M. y De Juan, J. (1995). Two types of mitochondria are evidenced by protein kinase C immunoreactivity in the Müller cells of the carp retina. *Neurosci. Lett.* **183**:202-205.
- Fine, B.S. y Zimmerman, L.E. (1962). Müller's cells and the "middle limiting membrane" of the human retina. *Invest. Ophthalmol.* **1**:304-326.
- Flanagan, M.D. y Lin, S. (1979). Comparative studies on the characteristic properties of two forms of brain actin separable by isoelectric focussing. *J. Neurochem.* **32**:1037-1046.

Forscher, P. y Smith, S.J. (1988). Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J. Cell. Biol.* **107**:1505-1516.

Freshney, R.I. (1987). *Culture of animal cells. A Manual of Basic Technique*. Alan. R. Liss, Inc, New York.

Fujita, S. (1963). The matrix cell and cytogenesis in the developing central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **120**:37-42.

Gaur, V.P.; Eldred, W. y Sarthy, P.V. (1988). Distribution of Müller cells in the turtle retina: an immunocytochemical study. *J. Neurocytol.* **17**:683-692.

Génis-Gálvez, J.M.; Puellas, L. y Prada, C. (1977). Inverted (displaced) retinal amacrine cells and their embryonic development in the chick. *Exp. Neurol.* **56**:151-157.

Goldberg, D.J. y Burmeister, D.W. (1989). Looking into growth cones. *TINS.* **12**:503-506.

Goldman, J.E. y Abramson, B. (1990). Cyclic AMP-induced shape changes of astrocytes are accompanied by rapid depolymerization of actin. *Brain Res.* **528**:189-196.

Gordon-Weeks, P.R. (1993). Organization of microtubules in axonal growth cones: a role for microtubule-associated protein MAP 1B. *J. Neurocytol.* **22**:717-725.

Gotow, T. y Hashimoto, P.H. (1989). Orthogonal arrays of particles in plasma membranes of Müller cells in the guinea pig retina. *Glia* **2**:273-285.

Goureau, O.; Hicks, D.; Courtois, Y. y De Kozak, Y. (1994). Induction and regulation of nitric oxide synthase in retinal Müller glial cells. *J. Neurochem.* **63**:310-317.

Grosche, J.; Härtig, W. y Reichenbach, A. (1995). Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Müller (glial) cells in retinal light damage of rats. *Neurosci. Lett.* **185**:119-122.

Guillemot, F. y Cepko, C.L. (1992). Retinal fate and ganglion cell differentiation are potentiated by acidic FGF in an *in vitro* assay of early retinal development. *Development* **114**:743-754.

Hamburger, V. y Hamilton, H. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**:49-92.

Harman, A.M. y Beazley, L.D. (1987). Patterns of cytogenesis in the retina of the wallaby, *Setonix brachyurus*. *Anat. Embryol.* **177**:123-130.

Harman, A.M. y Beazley, L.D. (1989). Generation of retinal cells in the wallaby, *Setonix brachyurus*. *Neurosci.* **28**:219-232.

- Harman, A.M.; Sanderson, K.J. y Beazley, L.D. (1992). Biphasic retinal neurogenesis in the brush-tailed possum, *Trichosurus vulpecula*: further evidence for the mechanisms involved in formation of ganglion cell density gradients. *J. Comp. Neurol.* **325**:595-606.
- Harris, W.A. y Messersmith, S.L. (1992). Two cellular inductions involved in photoreceptor determination in the *Xenopus* retina. *Neuron* **9**:357-372.
- Harstad, H.Kr. y Ringvold, A. (1985). Scanning and transmission electron microscopy of Müller cells isolated from rabbit retina. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **223**:29-34.
- Hatten, M.E. (1981). Cell assembly patterns of embryonic mouse cerebellar cells on carbohydrate-derivatized polylysine culture substrata. *J. Cell Biol.* **89**:54-61.
- Hatten, M.E. (1987). Neuronal inhibition of astroglial cell proliferation is membrane mediated. *J. Cell Biol.* **104**:1353-1360.
- Hatten, M.E. y Liem, R.K.H. (1981). Astroglia provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons *in vitro*. *J. Cell Biol.* **90**: 622-630.
- Hatton, J.D. y Ellisman, M.H. (1982). The distribution of orthogonal arrays in freeze-fractured rat median eminence. *J. Neurocytol.* **11**:335-349.
- Hemmati-Brivanlou, A.; Mann, R.W. y Harland, R.M. (1992). A protein expressed in the growth cones of embryonic vertebrate neurons defines a new class of intermediate filament protein. *Neuron* **9**:417-428.
- Henshel, D.S. y Miller, R.F. (1992). Catecholamine effects on dissociated tiger salamander Müller (glial) cells. *Brain Res.* **575**:208-214.
- Hernández-Sánchez, C.; Frade, J.M. y de la Rosa, E.J. (1994). Heterogeneity among neuroepithelial cells in the chick retina revealed by immunostaining with monoclonal antibody PM1. *Eur. J. Neurosci.* **6**:105-114.
- Hickey, W.F. y Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. *Science* **239**:290-292.
- Hicks, D. y Courtois, Y. (1990). The growth and behaviour of retinal Müller cells *in vitro*: an improved method for isolation and culture. *Exp. Eye Res.* **51**:119-129.
- Hildebrand, C. y Waxman, S.G. (1983). Regional node-like membrane specializations in non-myelinated axons of rat retinal nerve fiber layer. *Brain Res.* **258**:23-32.
- Hinds, J.W. y Hinds, P.L. (1974). Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: an electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Dev. Biol.* **37**:381-416.
- Hinds, J.W. and Ruffet, T.L. (1971). Cell proliferation in the neural tube: an electron microscopic and Golgi analysis in the mouse cerebral vesicle. *Z. Zellforsch.* **115**:226-264.

- Holländer, H.; Makarov, F.; Dreher, Z.; Van Driel, D.; Chan-Ling, T. y Stone, J. (1991). Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. *J. Comp. Neurol.* **313**:587-603.
- Holt, C.E.; Bertsch, T.W.; Ellis, H.M. y Harris, W.A. (1988). Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron.* **1**:15-26.
- Hughes, W.F. y La Velle, A. (1975). The effects of early tectal lesions on development in the retinal ganglion cell layer of chick embryos. *J. Comp. Neurol.* **163**:256-284.
- Hume, D.A.; Perry, V.H. y Gordon, S. (1983). Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: Phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J. Cell Biol.* **97**:253-257.
- Humphrey, M.F.; Constable, I.J.; Chu, Y. y Wiffen, S. (1993) A quantitative study of the lateral spread of Müller cell responses to retinal lesions in the rabbit. *J. Comp. Neurol.* **334**:545-558.
- Hunter, D.D.; Murphy, M.D.; Olsson, C.V. y Brunken, W.J. (1992). S-Laminin expression in adult and developing retinæ: a potential cue for photoreceptor morphogenesis. *Neuron* **8**:399-413.
- Huxlin, K.R.; Dreher, Z.; Schulz, M. y Dreher, B. (1995) Glial reactivity in the retina of adult rats. *Glia* **15**:105-118.
- Hyde, J.C. y Robinson, N. (1974). Localization of sites of GABA catabolism in the rat retina. *Nature (London)* **248**:432-433.
- Ikeda, T. y Puro, D.G. (1994). Nerve growth factor: a mitogenic signal for retinal Müller glial cells. *Brain Res.* **649**:260-264.
- Jaeger, C.B. (1988). Plasticity of astroglia: evidence supporting process elongation by "stretch". *Glia* **1**:31-38.
- Jiang, B.; Bezhadian, M.A. y Caldwell, R.B. (1995). Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: Effects on endothelial cell differentiation. *Glia* **15**:1-10.
- Jones, P.S. y Schechter, N. (1987). Distribution of specific intermediate-filament proteins in the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* **266**:112-121.
- Jordan, F.L. y Thomas, W.E. (1988). Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res. Rev.* **13**:165-178.
- Kahn, A.J. (1974). An autoradiographic analysis of the time and appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev. Biol.* **38**: 30-40.

- Kaneda, M.; Nakamura, H. y Akaike, N. (1988). Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons. *Neurosci. Res.* **5**:299-315.
- Karschin, A.; Wässle, H. y Schnitzer, J. (1986). Immunocytochemical studies on astroglia of the cat retina under normal and pathological conditions. *J. Comp. Neurol.* **249**:564-576.
- Karwowski, C.J.; Lu, H.-K. y Newman, E.A. (1989). Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Müller (glial) cells. *Science* **244**:578-580.
- Kater, S.B. y Rehder, V. (1995). The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**:68-74.
- Kay, A.R. y Wong, R.K.S. (1986). Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous system. *J. Neurosci. Methods* **16**:227-238.
- Keirstead, S.A. y Miller, R.F. (1995). Calcium waves in dissociated retinal glial (Müller) cells are evoked by release of calcium from intracellular stores. *Glia* **14**:14-22.
- Kelley, M.V.V.; Turner, J.K. y Reh, T.A. (1994). Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors *in vitro*. *Development* **120**:2091-2102.
- Kljavin, I.J. y Reh, T.A. (1991). Müller cells are a preferred substrate for *in vitro* neurite extension by rod photoreceptor cells. *J. Neurosci.* **11**:2985-2994.
- Koh, S.-W.M.; Kyritsis, A. y Chader, G.J. (1984). Interaction of neuropeptides and cultured glial (Müller) cells of the chick retina: Elevation of intracellular cyclic AMP by vasoactive intestinal peptide and glucagon. *J. Neurochem.* **43**:199-203.
- Kondo, H.; Iwanaga, T. y Nakajima, T. (1983). An immunocytochemical study of the localization of S-100 protein in the retina of rats. *Cell Tissue Res.* **231**:527-532.
- Koyama, Y. y Baba, A. (1994). Endothelins are extracellular signals modulating cytoskeletal actin organization in rat cultured astrocytes. *Neuroscience* **61**:1007-1016.
- Kreutzberg, G.W. y Hussain, S.T. (1982). Cytochemical heterogeneity of the glial plasma membrane: 5'-nucleotidase in retinal Müller cells. *J. Neurocytol.* **11**:53-64.
- Kuwabara, T. y Weidman, T.A. (1974). Development of the prenatal rat retina. *Invest. Ophthalmol.* **13**:725-739.
- Ladman, A.J. y Soper, E.H. (1962). Preliminary observations on the fine structure of Müller cell of the avian retina. *5th Congr. Electron Microsc. Academic Press.* pp R6.
- Lake, N.; Marshall, J. y Voaden, M.J. (1978). High affinity uptake sites for taurine in the retina. *Exp. Eye Res.* **27**:713-718.

- Lam, D.M.K. (1972). Biosynthesis of acetylcholine in turtle photoreceptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **69**:1987-1991.
- Landis, D.M.D. y Reese, T.S. (1974). Arrays of particles in freeze-fractured astrocytic membranes. *J. Cell Biol.* **60**:316-320.
- Legrand, C.; Ferranz, C.; Clavel, M.-C. y Rabié, A. (1991). Distribution of gelsolin in the retina of the developing rabbit. *Cell Tissue Res.* **264**:335-338.
- Lemmon, V. (1985). Monoclonal antibodies specific for glia in the chick nervous system. *Dev. Brain Res.* **23**:111-120.
- Lemmon, V. (1986). Localization of a filamin-like protein in glia of the chick central nervous system. *J. Neurosci.* **6**:43-51.
- Lemmon, V. y Rieser, G. (1983). The developmental distribution of vimentin in the chick retina. *Dev. Brain Res.* **11**:191-197.
- Leong, S.-K. y Ling, E.-A. (1992). Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* **6**:39-47.
- Letourneau, P.C. (1983). Differences in the organization of actin in the growth cones compared with the neurites of cultured neurons from chick embryos. *J. Cell Biol.* **97**:963-973.
- Lewis, G.P.; Erickson, P.A.; Guérin, C.J.; Anderson, D.H. y Fisher, S.K. (1989). Changes in the expression of specific Müller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp. Eye Res.* **49**:93-111.
- Li, H. y Sheffield, J. D. (1984). Isolation and characterization of flat cells, a subpopulation of the embryonic chick retina. *Cell Tissue Res.* **16**:843-857.
- Liepe, B.A.; Stone, C.; Koistinaho, J. y Copenhagen, D.R. (1994). Nitric oxide synthase in Müller cells and neurons of salamander and fish retina. *J. Neurosci.* **14**:7641-7654.
- Lillien, L. y Cepko, C. (1992). Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF α . *Development* **115**:253-266.
- Ling, E.-A. y Wong, W.-C. (1993). The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* **7**:9-18.
- Linser, P. y Moscona, A.A. (1979). Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Müller fibers and dependence on cell interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:6476-6480.

Linser, P. y Moscona, A.A. (1981). Carbonic anhydrase C in the neural retina: Transition from generalized to glia-specific cell localization during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78**:7190-7194.

Linser, P.J. y Perkins, M.S. (1987). Regulatory aspects of the *in vitro* development of retinal Müller glia cells. *Cell Diff.* **20**:189-196.

Linser, P.J.; Smith, K. y Angelides, K. (1985). A comparative analysis of glial and neuronal markers in the retina of fish: Variable character of horizontal cells. *J. Comp. Neurol.* **237**:264-272.

Linser, P.J.; Sorrentino, M. y Moscona, A.A. (1984). Cellular compartmentalization of carbonic anhydrase-C and glutamine synthetase in developing and mature mouse neural retina. *Dev. Brain Res.* **13**:65-71.

López-Colomé, A.M.; Ortega, A. y Romo-de-Vivar, M. (1993). Excitatory amino acid-induced phosphoinositide hydrolysis in Müller glia. *Glia* **9**:127-135.

López-Gallardo, M.; Prada, F.; Quesada, A.; Medina, J.I.; Spira, A. y Prada, C. (1995). Co-localization of GABA and Choline acetyltransferase immunoreactivity in displaced amacrine cells in the early developing retina. *Proc. of the Congress of the European Developmental Biology Organization (EDBC 95)*, pág. 55.

López-Gallardo, M. (1995) Desarrollo de las células piramidales del hipocampo de rata y estudio de su contenido en ADN. *Ediciones Universidad Complutense. Tesis Doctoral*. En prensa.

López-López, M.R. (1991). Neurogénesis y diferenciación de los fotorreceptores de la retina. Estudio en el embrión de pollo. *Ediciones Universidad Complutense. Tesis Doctoral*. 1991, pp:1-229.

Madreperla, S.A. y Adler, R. (1989). Opposing microtubule- and actin-dependent forces in the development and maintenance of structural polarity in retinal photoreceptors. *Dev. Biol.* **131**:149-160.

Magalhães, M.M. y Coimbra, A. (1970). Electron microscope radioautographic study of glycogen synthesis in the rabbit retina. *J. Cell Biol.* **47**:263-275.

Magalhães, M.M. y Coimbra, A. (1972). The rabbit retina Müller cell. A fine structural and cytochemical study. *J. Ultrastruct. Res.* **39**:310-326.

Magalhães, M.M. y Coimbra, A. (1973). Electron microscope autoradiographic detection of sites of protein synthesis in the rabbit retina Müller cells. *J. Cell. Biol.* **57**:77-87.

Malchow, P. M.; Qian, H. y Ripps, H. (1989). gamma-aminobutyric acid (GABA)-induced currents of skate Müller (glial) cells mediated by neuronal-like GABA_A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**:4326-4330.

- Mantych, G.J.; Hageman, G.S. y Devaskar, S.U. (1993). Characterization of glucose transporter isoforms in the adult and developing human eye. *Endocrinology* **133**:600-607.
- Mason, C.A.; Edmondson, J.C. y Hatten, M.E. (1988) The extending astroglial process: development of glial cell shape, the growing tip, and interactions with neurons. *J. Neurosci.* **8**:3124-3134.
- McCabe, C.F. y Cole, G.J. (1992). Expression of the barrier- associated proteins EAP-300 and claustrin in the developing central nervous system. *Dev. Brain Res.* **70**:9-24.
- McCarthy, K.D. y De Vellis, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cells cultured from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* **85**:890-902.
- McLoon, S.C. y Barnes, R.B. (1989). Early differentiation of retinal ganglion cells: An axonal protein expressed by premigratory an migrating retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* **9**:1424-1432.
- Meller, K. (1987). Gradient isolation of glial cells: Evidence that flat epithelial cells are astroglial cell precursors. *Cell Tissue Res.* **249**:79-88.
- Meller, K. y Glees, P. (1965). The differentiation of neuroglia -Müller- cells in the retina of chick. *Z. Zellforsch.* **66**:321-332.
- Meller, K. y Tetzlaff, W. (1976). Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. *Cell Tissue Res.* **170**:145-159.
- Miller, R.F. y Dowling, J.E. (1970). Intracellular responses of the Müller (glial) cells of the mudpuppy retina: Their relation to b-wave of the electroretinogram. *J. Neurophysiol.* **33**:323-341.
- Moore, C.L. y Gruberg, E.R. (1974). The distribution of succinic semialdehyde dehydrogenase in the brain and retina of the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*). *Brain Res.* **67**:467-478.
- Morest, D.K. (1970). The pattern of neurogenesis in the retina of the rat. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **131**:45-67.
- Morón, A. (1992). Diferenciación de la retina de los vertebrados: ciclo celular, morfogénesis y determinación del contenido de DNA de los fotorreceptores. Estudio en la rata. *Ediciones Universidad Complutense. Tesis Doctoral.* En prensa.
- Moscona, A. (1961). Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells: A quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Exp. Cell Res.* **22**:455-475.
- Müller, H. (1851). Zur histologie der Netzhaut. *Z. wiss. Zool.* **3**:234.

- Murphy, S. y Pearce, B. (1987). Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neurosci.* **22**:381-394.
- Nakazawa, T.; Tachi, S.; Aikawa, E. y Ihnuma, M. (1993). Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina. *Glia.* **8**:114-121.
- Negishi, K.; Teranishi, T. y Kato, S. (1982). New dopaminergic and indoleamine-accumulating cells in the growth zone of goldfish retinas after neurotoxic destruction. *Science.* **216**:747-749.
- Newman, E.A. (1984). Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature* **309**:155-157.
- Newman, E.A. (1985a). Membrane physiology of retinal glial (Müller) cells. *J. Neurosci.* **5**:2225-2239.
- Newman, E. A. (1985b). Voltage dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature* **317**:809-811.
- Newman, E.A. (1987). Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: a comparative study. *J. Neurosci.* **7**:2423-2432.
- Newman, E.A. (1991). Sodium-bicarbonate cotransport in retinal Müller (glial) cells of the salamander. *J. Neurosci.* **11**:3972-3983.
- Newman, E.A. (1993). Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. *J. Neurosci.* **13**:3333-3345.
- Newman, E.A. (1994). A physiological measure of carbonic anhydrase in Müller cells. *Glia* **11**:291-299.
- Newman, E.A.; Frambach, D.A. y Odette, L.L. (1984). Control of extra cellular potassium levels by retinal glial cells K⁺ siphoning. *Science* **225**:1174-1175.
- Nilius, B. y Reichenbach, A. (1988). Efficient K⁺ buffering by mammalian retinal glial cells is due to cooperation of specialized ion channels. *Pflügers Arch.* **411**: 654-660.
- Nona, S.N.; Shehab, S.A.S.; Stafford, C.A. y Cronly-Dillon, J.R. (1989). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) from goldfish: Its localisation in visual pathway. *Glia.* **2**:189-200.
- Ohanian, C. (1972). Histochemical studies on phosphorylase activity in the tissues of the albino rat under normal and experimental conditions. *Acta Histochem.* **44**:244-263.
- Parck, C.M. y Hollenberg, M.J. (1989). Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. *Dev. Biol.* **134**:201-205.

Pfeiffer, B.; Grosche, J.; Reichenbach, A. y Hamprecht, B. (1994). Immunocytochemical demonstration of glycogen phosphorylase in Müller (glial) cells of the mammalian retina. *Glia* 12:62-67.

Philp, N.J. y Nachmias, V.T. (1985). Components of the cytoskeleton in the retinal pigmented epithelium of the chick. *J. Cell. Biol.* 101:358-362.

Pittack, C.; Jones, M. y Reh, T.A. (1991). Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina *in vitro*. *Development* 113:577-588.

Poitry-Yamate, C. L. y Tsacopoulos, M. (1992). Glucose metabolism in freshly isolated Müller glial cell from a mammalian retina. *J. Comp. Neurol.* 320:257-266.

Pollenz, R.S. y McCarthy, K.D. (1986) Analysis of cyclic AMP-dependent changes in intermediate filament protein phosphorylation and cell morphology in cultured astroglia. *J. Neurochem.* 47:9-17.

Polyak, S.L. (1941). *The retina*. University of Chicago Press. Chicago.

Prada, C.; Medina, J.I.; López, R.; Génis-Gálvez, J.M. y Prada, F.A. (1992). Development of displaced ganglion cells in the chick: neurogenesis and morphogenesis. *J. Neurosci.* 12:3781-3788.

Prada, C.; Puelles, L. y Génis-Gálvez, J.M. (1981). A golgi study on the early sequence of differentiation of ganglion cells in the chick embryo retina. *Anat. and Embryol.* 161:305-317.

Prada, C.; Puelles, L.; Génis-Gálvez, J.M. y Ramirez, G. (1987). Two modes of free migration of amacrine cell neuroblasts in the chick retina. *Anat. and Embryol.* 175:281-287.

Prada, C.; Puga, J.; Perez-Méndez, L.; López, R. y Ramírez, G. (1991). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Europ. J. Neurosci.* 3:559-569.

Prada, C. y Ramirez, G. (1983). A Golgi study of the cell cycle and early neuron and glia differentiation in the chick retina. *Ramon y Cajal's contribution to the Neuroscience*. Elsevier Science Publis, B. V.

Prada, F.A.; Armengol, J.A. y Génis-Gálvez, J.M. (1979). La célula de Müller de la retina del camaleón (*Chamaleo chamaleo*). *Morfología normal y patológica Sec. A.* 3:129-144.

Prada, F.A.; Dorado, M.E.; Quesada, A.; Prada, C.; Schwarz, U. y De La Rosa, E.J. (1995) Early expression of a novel radial glia antigen in the chick embryo. *Glia* 15:389-400.

Prada, F.A.; Espinar, A.; Chmielewski, C.E.; Dorado, M.E. y Génis-Gálvez, J.M. (1989a). Regional adaptation of Müller cells in the chick retina. A Golgi and electron microscopical study. *Histol. and Histopath.* 4:309-315.

- Prada, F.A.; Magalhães, M.M.; Coimbra, A. y Genis-Gálvez, J.M. (1989b). Morphological Differentiation of the Müller Cell: Golgi and Electron Microscopy Study in the Chick Retina. *J. Morphol.* **201**:11-22.
- Puro, D.G. (1991). Stretch-activated channels in human retinal Müller cells. *Glia* **4**:456-460.
- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layer of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* **145**:61-84.
- Ramírez, J.M.; Triviño, A.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. y García Sánchez, J. (1994). Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Res.* **34**:1935-1946.
- Ramón y Cajal, S. (1892). La retina des vertébrés. *La Cellule* **9**:119-225. Traducido en 1972 por Thorpe, S.A. y Glickstein, M. Charles C. Thomas Publisher. Springfield, USA.
- Ramón y Cajal, S. (1909-1911). Histologie du système nerveux de l'home et des vertébrés. Reeditada en 1972 por Instituto Ramón y Cajal, C.S.I.C., Madrid.
- Rasmussen, K.E. (1972). A morphometric study of the Müller cell cytoplasm in the rat retina. *J. Ultrastruct. Res.* **44**:96-112.
- Rasmussen, K.E. (1973). A morphometric study of the Müller cells, their nuclei and mitochondria, in the rat retina. *J. Ultrastruct. Res.* **44**:96-112.
- Rasmussen, K.E. (1974). The Müller cell: A comparative study of rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye Res.* **20**:151-166.
- Rasmussen, K.E. (1975). A morphometric study of the Müller cell in rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye Res.* **20**:151-166.
- Raviola, G. (1977). The structural basis of the blood-ocular barriers. *Exp. Eye Res.* **25**:27-63.
- Reale, E.; Luciano, L. y Spitznas, M. (1978). Communicating junctions of the human sensory retina. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **192**:73-87.
- Reh, T.A. (1987). Cell-specific regulation of neuronal production in the larval frog retina. *J. Neurosci.* **7**:3317-3324.
- Reh, T.A. y Tully, T. (1986). Regulation of tyrosine hydroxylase-containing amacrine cell number in the larval frog retina. *Dev. Biol.* **114**:463-469.
- Reichelt, W. y Pannicke, T. (1993). Voltage-dependent K⁺ currents in guinea pig Müller (glial) cells show different sensitivities to blockade by Ba²⁺. *Neurosci. Lett.* **155**:15-18.

Reichenbach, A. (1987). Quantitative and qualitative morphology of rabbit retinal glia. A light microscopical study on cells both in situ and isolated by papaine. *J. Hirnforsch.* **28**:213-220.

Reichenbach, A. (1989). Attempt to classify glial cells by means of their process specialization using the rabbit retinal Müller cell as an example of cytotopographic specialization of glial cells. *Glia* **2**:250-259.

Reichenbach, A.; Baar, U.; Petter, H.; Schaff, P.; Osborne, N.N. y Buse, E. (1992). Neuronal ectopia in tiger retina. *J. Hirnforsch.* **33**:585-593.

Reichenbach, A. y Birkenmeyer, G. (1984). Preparation of isolated Müller cells of the mammalian (rabbit) retina. *Z. Mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig.* **5**:S:789-792.

Reichenbach, A.; Dettmer, D.; Brückner, G.; Neumann, N. y Birkenmeyer, G. (1985). Morphological variability, lectin binding and Na⁺, K⁺-activated adenosine triphosphatase activity of isolated Müller (glial) cells from the rabbit retina. *Neurosci. Lett.* **55**:29-34.

Reichenbach, A. y Eberhardt, W. (1986). Intracellular recordings from isolated rabbit retinal Müller (glial) cells. *Pflügers Arch.* **407**: 348-353.

Reichenbach, A.; Frömter, C.; Engelmann, R.; Wolburg, H.; Kasper, M. y Schnitzer, J. (1995). Müller glial cells of the tree shrew retina. *J. Comp. Neurol.* **360**:257-270.

Reichenbach, A.; Hagen, E.; Schippel, K.; Brückner, G.; Reichelt, W. y Leibnitz, L. (1988a). Cytotopographical specialization of enzymatically isolated rabbit retinal Müller cells: structure, ultrastructure, and ³H-ouabain binding sites. *Z. Mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig.* **6**:S:897-912.

Reichenbach, A.; Hagen, E.; Schippel, K. y Eberhardt, W. (1988b). Quantitative electron microscopy of rabbit Müller (glial) cells in dependence on retinal topography. *Z. Mikrosk.-anat. Forsch.* **102**:721-755.

Reichenbach, A. y Reichelt, W. (1986). Postnatal development of radial glial (Müller) cells of the rabbit retina. *Neurosci. Lett.* **7**:125-130.

Reichenbach, A. y Robinson, S.R. (1995). Ependymoglia and ependymoglia-like cells. In *Neuroglia* (Kettenman, H. y Ransom, B. eds.), Oxford University Press.

Reichenbach, A.; Schippel, K.; Schümann, R. y Hagen, E. (1988c). Ultrastructure of rabbit retinal nerve fibre layer - Neuro-glial relationships, myelination, and nerve fibre spectrum. *J. Hirnforsch.* **29**:481-491.

Reichenbach, A.; Schneider, H.; Leibnitz, L.; Reichelt, W.; Schaaf, P. y Schümann, R. (1989). The structure of rabbit retinal Müller cells is adapted to the surrounding retinal layers. *Anat. and Embryol.* **180**:71-79.

- Reichenbach, A. y Wohlrab, F. (1983). Quantitative properties of Müller cells in rabbit retina as revealed by histochemical demonstration of NADH-diaphorase activity. *Albrecht von Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **220**:81-83.
- Reichenbach, A. y Wohlrab, F. (1986). Morphometric parameters of Müller (glial) cells dependent on their topographic localization in the nonmyelinated part of the rabbit retina. A consideration of functional aspects of radial glia. *J. Neurocytol.* **15**:451-459.
- Reichenbach, A.; Wolburg, H.; Richter, W. y Eberhardt, W. (1990). Membrane ultrastructure preservation and membrane potentials after isolation of rabbit retinal glial (Müller) cells by papain. *J. Neurosci. Methods.* **32**:227-233.
- Reichenbach, A.; Ziegert, M.; Schnitzer, J.; Pritz-Hohmeier, S.; Schaaf, P.; Schober, W. y Schneider, H. (1994). Development of the rabbit retina. V. The question of "columnar units". *Dev. Brain Res.* **79**:72-84.
- Rhodes, R.H. (1984). Ultrastructure of Müller cells in the developing human retina. *Graefe's Arch. Ophthalmol.* **221**:171-178.
- Richter, W.; Reichenbach, A. y Reichelt, W. (1990). Orthogonal arrays of intramembranous particles in the Müller cell and astrocyte endfoot membrane of rabbit retina. Postnatal development and adulthood. *J. Neurocytol.* **19**:127-139.
- Riepe, R.E. y Noremburg, M.D. (1977). Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina. *Nature* **268**:654-655.
- Río-Hortega, P. del. (1919). El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglía normal. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglía. *Bol. Soc. Esp. Biol.* **9**:69-129.
- Robinson, S.R. y Dreher, Z. (1990). Müller Cells in Adult Rabbit Retinae: Morphology, Distribution and Implications for Function and Development. *J. Comp. Neurol.* **292**:178-192.
- Robinson, S.R.; Hampson, E.C.G.M.; Munro, M.N. y Vaney, D.I. (1993). Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science* **262**:1072-1074.
- Rodieck, R.W. (1973). *The vertebrate retina: principles of structure and function*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, pp. 338-368.
- Rungger-Brändle, E.; Messerli, J.M.; Niemeyer, G. y Eppenberger, J.M. (1993). Confocal microscopy and computer assisted image reconstruction of astrocytes in the mammalian retina. *Eur. J. Neurosci.* **5**:1093-1106.
- Saari, J.C.; Bunt-Milam, A.H.; Bredberg, D.L. y Garwin, G.G. (1984). Properties and immunocytochemical localization of three retinoid-binding proteins from bovine retina. *Vision Res.* **24**:1595-1603.

- Salm, A.K.; Smithson, K.G. y Hatton, G.I. (1985). Lactation-associated redistribution of the glial fibrillary acidic protein within the supraoptic nucleus. *Cell Tissue Res.* **242**:9-15.
- Sarthy, P.V. (1982). The uptake of [³H] gamma-aminobutyric acid by isolated glial (Müller) cells from the mouse retina. *J. Neurosci. Meth.* **5**:77-82.
- Sarthy, P.V. (1983). Release of [³H] gamma-aminobutyric acid from glial (Müller) cells of the rat retina: effects of K⁺, veratridine, and ethilendiamine. *J. Neurosci.* **3**:2494-2503.
- Sarthy, P.V. (1985). Establishment of Müller cell cultures from adult rat retina. *Brain Res.* **337**:138-141.
- Sarthy, P.V.; Bridges, C.D.; Kretzer, F.L. y Lam, D.M.K. (1981). Lectin receptors on cells isolated from the turtle retina. *J. Comp. Neurol.* **202**:561-569.
- Sarthy P. V. y Bunt, A. H. (1982). The ultrastructure of isolated glial (Müller) cells from the turtle retina. *Anat. Rec.* **202**:275-283.
- Sarthy P. V. and Lam D. M. K. (1978). Biochemical studies of isolated glial (Müller) cells from turtle retina. *J. Comp. Neurol.* **202**:561-569.
- Sauer, F.C. (1935). Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* **62**:377-405.
- Sauer, F. C. y Walker, B. E. (1959). Radioautographic studies of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **101**:557-560.
- Schlosshauer, B.; Grauer, D.; Dotting, D. y Vanselow, J. (1991). Expression of a novel Müller glia specific antigen during development and after optic nerve lesion. *Development* **111**:789-799.
- Schnitzer, J. (1985). Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *J. Comp. Neurol.* **240**:128-142.
- Schnitzer, J. (1988). Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Dev. Brain Res.* **44**:59-72.
- Schnitzer, J.; Franke, W.W. y Schachner, M. (1981). Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of the developing and adult mouse nervous system. *J. Cell Biol.* **90**:435-447.
- Schnitzer, J. y Karschin, A. (1986). The shape and distribution of astrocytes in the retina of the adult rabbit. *Cell Tissue Res.* **246**:91-102.
- Schulze, E. y Neuhoff, V. (1983). Uptake, autoradiography and release of taurine and homotaurine from retinal tissue. *Int. J. Neurosci.* **18**:253-268.

Schwarz, E.A. (1993). L-glutamate conditionally modulates the K⁺ current of Müller glial cells. *Neuron* 10:1141-1149.

Semple-Rowland, S.L. (1991). Expression of glial fibrillary acidic protein by Müller cells in *rd* chick retina. *J. Comp. Neurol.* 305:582-590.

Shain, W.; Bausback, D.; Fiero, A.; Madelian, V. y Turner, J.N. (1992). Regulation of receptor-mediated shape change in astroglial cells. *Glia* 5:223-238.

Shain, W.; Forman, D.S.; Madelian, V. y Turner, J.N. (1987). Morphology of astroglial cells is controlled by beta-adrenergic receptors. *J. Cell Biol.* 105:2307-2314.

Shao, Y.; Enkvist, M.O.K. y McCarthy, K.D. (1994). Glutamate blocks astroglial stellation: effect of glutamate uptake and volume changes. *Glia* 11:1-10.

Shaw, G. y Weber, K. (1983). The structure and development of the rat retina: An immunofluorescence microscopical study using antibodies specific for intermediate filament proteins. *Eur. J. Cell Biol.* 30:219-232.

Sidman, R.L.; Miale, I.L. y Feder, N. (1959). Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp. Neur.* 1:322-333.

Sievers, J.; Parwaresch, R. y Wottge, H.-U. (1994). Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes. Morphology. *Glia*. 12:245-258.

Sinha, U.; Wolz, S.A. y Lad, P.J. (1991). Two new extracellular serine proteases from *Streptomyces fradiae*. *Int. J. Biochem.* 23:979-984.

Skatchkov, S.N.; Vyklický, L. y Orkand, R.K. (1995). Potassium currents in endfeet of isolated Müller cells from the frog retina. *Glia* 15:54-64.

Skene, J.H.P.; Jacobson, R.D.; Snipes, G.J.; McGuire, C.B.; Norden, J.J. y Freeman, J.A. (1986). A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. *Science* 233:783-786.

Small, R.K.; Patel, P. y Watkins, B.A. (1991). Response of Müller cells to growth factors alters with time in culture. *Glia* 4:469-483.

Small, R.K.; Watkins, B.A.; Munro, P.M. y Liu, D. (1993). Functional properties of retinal Müller cells following transplantation to the anterior eye chamber. *Glia* 7:158-169.

Stefansson, K.; Molnar, M.L.; Marton, L.S.; Molnar, G.K.; Mihovilovic, M.; Tripathi, R.C. y Richman, D.P. (1984). Myelin-associated glycoprotein in human retina. *Nature* 307:548-550.

- Stirling, C.E. y Sarthy, P.V. (1985). Localization of the Na-K pump in turtle retina. *J. Neurocytol.* **14**:33-47.
- Stone, J. y Dreher, Z. (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and the vasculature of the retina. *J. Comp. Neurol.* **255**:35-49.
- Stone, J.; Holländer, H. y Dreher, Z. (1991). "Sunbursts" in the inner plexiform layer: a spectacular feature of Müller cells in the retina of the cat. *J. Comp. Neurol.* **303**:400-411.
- Szaro, B.G. y Gainer, H. (1988). Immunocytochemical identification of non-neuronal intermediate filament proteins in the developing *Xenopus laevis* nervous system. *Dev. Brain Res.* **43**:207-224.
- Tachibana, M. (1981) Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. *J. Physiol.* **321**:141-161.
- Thanos, S. (1992). Sick photoreceptors attract activated microglia from the ganglion cell layer: a model to study the inflammatory cascades in rats with inherited retinal dystrophy. *Brain Res.* **588**:21-28.
- Theele, D.P. y Streit, W.J. (1993). A chronicle of microglial ontogeny. *Glia.* **7**:5-8.
- Torrelli, S.; Sogos, V.; Marzilli, M.A.; D'Atri, M. y Gremo, F. (1989). Developmental expression of intermediate filament proteins in the chick embryo retina: *in vivo* and *in vitro* comparison. *Exp. Biol.* **48**:187-196.
- Torres-Alemán, I.; Rejas, M.T.; Pons, S. y García-Segura, L.M. (1992). Estradiol promotes cell shape changes and glial fibrillary acidic protein redistribution in hypothalamic astrocytes *in vitro*: a neuronal-mediated effect. *Glia* **6**:180-187.
- Tout, S.; Chan-Ling, T.; Holländer, H. y Stone, J. (1993). The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neurosci.* **55**:291-301.
- Trachtenberg, M.C. y Packey, D.J. (1983). Rapid isolation of mammalian Müller cells. *Brain Res.* **261**:43-52.
- Triviño, A.; Ramírez, J.M.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. y García-Sánchez, J. (1992). Retinal perivascular astroglia: an immunoperoxidase study. *Vision Res.* **32**:1601-1607.
- Turner, R.W.; Borg, L.L. y Syed, N.I. (1995). A technique for the primary dissociation of neurons from restricted regions of the vertebrate CNS. *J. Neurosci. Methods* **56**:57-70.
- Turner, D.L. y Cepko, C.L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* **328**:131-136.
- Turner, D.L.; Snyder, E.Y. y Cepko, C.L. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* **4**:833-845.

- Uchihori, Y. y Puro, D.G. (1993). Glutamate as a neuron-to-glial signal for mitogenesis: role of glial N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* **613**:212-220.
- Uga, S. y Smelser, G.K. (1973a). Comparative study of the fine structure of retinal Müller cells in various vertebrates. *Invest. Ophthalmol.* **12**:295-307.
- Uga, S. y Smelser, G.K. (1973b). Electron microscopic study of the development of retinal Müllerian cells. *Invest. Ophthalmol.* **12**:295-307.
- Ulloa, L. y Avila, J. (1996). Involvement of β and γ -actin isoforms in neuroblastoma differentiation. *Europ. J. Neurosci.* **En prensa**.
- Van Harreveld, A. (1982). Swelling of the Müller fibers in the chicken retina. *J. Neurobiol.* **13**:519-536.
- Vandekerckhove, J. y Weber, J. (1978). Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**:1106-1110.
- Walls, G.L. (1942). *The vertebrate eye and its adaptive radiation*. Michigan: Cranbrook Press.
- Watanabe, T.; Mio, Y.; Hoshino, F.B.; Nagamatsu, S.; Hirose, K. y Nakahara, K. (1994). GLUT2 expression in the rat retina: localization at the apical ends of Müller cells. *Brain Res.* **655**:128-134.
- Watanabe, T. y Raff, M.C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* **332**:834-837.
- Watanabe, T. y Raff, M.C. (1992). Rod photoreceptor development *in vitro*: intrinsic properties of proliferating neuroepithelial cells change as development proceeds in the rat retina. *Neuron* **2**:461-467.
- Way, M. y Weeds, A. (1990). Cytoskeletal ups and downs. *Nature* **344**:292-294.
- Waymouth, C. (1974). To disaggregate or not to disaggregate, injury and cell disaggregation, transient or permanent?. *In vitro* **10**:97-111.
- Waymouth, C. (1982). Methods for obtaining cells in suspensions from animal tissues. In *Cell separation methods and selected applications* (Pretlow Th. G. and Pretlow Th. P. eds.). Vol 1, pp. 1-29. Academic Press, Inc. New York.
- Weiler, R. y Janssen-Bienhold, U. (1993). Spinule-type neurite outgrowth from horizontal cells during light adaptation in the carp retina: an actin-dependent process. *J. Neurocytol.* **22**:129-139.

Weinstein, D.E.; Shelanski, M.L. y Liem, R.K.H. (1991). Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J. Cell. Biol.* **112**:1205-1213.

Wetts, R. y Fraser, S.E. (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* **239**:1142-1145.

Wetts, R.; Serbedzija, G.N. y Fraser, S.E. (1989). Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev. Biol.* **136**:254-263.

Williams, D.S.; Arikawa, K. y Paallysaho, T. (1990). Cytoskeletal components of the adherens junctions between the photoreceptors and the supportive Müller cells. *J. Comp. Neurol.* **295**:155-164.

Wolburg, H. y Berg, K. (1987). Heterogeneity of Müller cell endfeet in the rabbit retina as revealed by freeze-fracturing. *Neurosci. Lett.* **82**:273-277.

Wolburg, H. y Berg, K. (1988). Distribution of orthogonal arrays of particles in the Müller cell membrane of the mouse retina. *Glia* **1**:246-252.

Wolburg, H.; Berg, K. y Naujoks-Manteuffel, C. (1992). Müller (glial) cells in the retina of urodeles and anurans reveal different morphology by means of freeze-fracturing. *Neurosci. Lett.* **138**:89-92.

Wolburg, H.; Reichelt, W.; Stolzenburg, J.-U.; Richter, W. y Reichenbach, A. (1990). Rabbit retinal Müller cells in cell culture show gap and tight junctions which they do not express in situ. *Neurosci. Lett.* **111**:58-63.

Wolter, J.R. (1957). Perivascular glia of the blood vessels of the human retina. *Am. J. Ophthalmol.* **44**:766-773.